

Aus der Medizinischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Ausarbeitung unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kraft
(Komm. Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Ulrich)

Methoden und Parameter für das Studium der Erythropoese

Die Anwendung der Fe 59 Markierungstechnik

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ferenc T. Szalay
aus Sopron

München 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554604_0059

Aus der Medizinischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Ausarbeitung unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kraft
(Komm. Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Ulrich)

Methoden und Parameter für das Studium der Erythropoese

Die Anwendung der Fe 59 Markierungstechnik

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ferenc T. Szalay

aus Sopron

München 1973

Aus der Medizinischen Fakultät der Universität München
der Medizinischen Fakultät
Ausstellung unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kraft
(Komm. Vorstand: Prof. Dr. H. Kraft)

Methoden und Parameter für das Studium der Erythropoese

Die Anwendung der Fe 59-Markierungstechnik

von Prof. Dr. H. Kraft

an der Fakultät für Medizinische Wissenschaften
der Universität München
der Fakultät für Medizinische Wissenschaften



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. H. Kraft
Korreferent: Prof. Dr. J. Frewein

Tag der Promotion: 27. Juli 1973

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
LITERATURÜBERSICHT, EXPERIMENTE, DISKUSSION	
Teil I Derzeitige Kenntnisse zur Erythropoese	2
Teil II Versuchsanordnungen zur Untersuchung der Erythropoese	8
Teil III Die Anwendung von Fe 59 zur Untersuchung der Ferrokinetik und Erythropoese	15
A. Eigenschaften, Applikation und Dosierung des Fe 59	15
B. Ferro-kinetische Prinzipien und ihr Verhält- nis zur Erythropoese	18
C. Methoden und Parameter für das Studium der Erythropoese die bei Verwendung von Fe 59 erhalten werden können	26
Teil IV Bestimmung der Lebenszeiten von Erythrozyten mit Hilfe von Fe 59	38
Teil V Studium der Erythrokinetik mit Fe 59-Auto- radiographie	42
DISKUSSION der Teile I-V	47
ZUSAMMENFASSUNG.	50
LITERATURVERZEICHNIS	56

EINLEITUNG

Zum Studium der Erythropoese haben sich die Anwendung radioaktiver Isotope, besonders Fe 59 und die Tracer-Methode als sehr fruchtbar erwiesen. Damit konnten sich unsere Kenntnisse der Erythropoese erweitern und durch Ersatz der herkömmlichen, mehr oder weniger unbefriedigenden Methoden, die im Gang befindlichen Untersuchungen bedeutend erleichtern.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch das Studium der Literatur und eigener experimenteller Erfahrung sowohl die wichtigsten Parameter und Methoden der Fe 59 Markierungstechnik und die Versuchsanordnungen, in denen sie verwendet sind, zu analysieren, als auch auf die nicht zu übersehenden Mängel dieser trotzdem brauchbaren und weit verbreiteten Methode für die Bestimmung der Erythropoese hinweisen. In diesem Rahmen fasse ich auch die heutigen Erfahrungen bezüglich der Erythropoese zusammen und erörtere die ferrokinetischen Prinzipien, die den Fe 59 Metabolismus im Körper steuern und ihr Verhältnis zur Erythropoese.

LITERATURÜBERSICHT, EXPERIMENTE, DISKUSSION

TEIL I

DERZEITIGE KENNTNISSE ZUR ERYTHROPOESE

Die Bildung von roten Blutzellen wird durch einen humoralen Faktor gesteuert (CARNOT und DEFLANDRE, 1906; GRANT und ROOT, 1952; GORDON, 1959; REMMELE, 1963), der unterschiedlich als Hämopoetin (GRANT und ROOT, 1952), Erythropoetin oder Erythropoietic Stimulating Factor (ESF) (GORDON, 1959) bezeichnet wird. Die Existenz eines derartigen Faktors wurde zuerst von CARNOT und DEFLANDRE in 1906 angenommen und seither von zahlreichen Forschern nachgewiesen. Wie die verschiedenen Bezeichnungen dieses humoralen Faktors jedoch zeigen, ist seine Natur - insbesondere ob es sich um eine oder mehrere Substanzen handelt - noch nicht geklärt.

1. Grundsätzlicher Stimulus zur Erythropoese

Aus der Literatur geht hervor, daß O_2 -Mangel der entscheidende Faktor für die Anregung der Erythropoese ist (FRIED et al., 1957; GOLDWASSER et al., 1958; GORDON, 1959; COTES und BANGHAM, 1961; DEGOWIN et al., 1962). Die Erythropoese wird jedoch nicht direkt durch einen Sauerstoffmangel im Knochenmark, sondern indirekt durch Erythropoetin stimuliert (GRANT und ROOT, 1952), welches sich im Plasma gesunder Tiere in einer Menge von 0,02 E/ml (GRANT und ROOT, 1952) und in höheren Werten im Plasma von Tieren, die einer Hypoxie oder einer Blutungsanämie ausgesetzt wurden (PLZAK et al., 1955; THOMPSON und JEREMBY, 1962), befindet. Durch sauerstoffempfindliche Zellen, die sich wahrscheinlich im Zwischenhirn und in der Körperperipherie befinden, wird die Erythropoetinbildung stimuliert (RUHENSTROTH-BAUER, 1950). Wichtig ist das Verhältnis zwischen dem Sauerstoffdruck des Blutes und dem Bedürfnis des Gewebes

nach Sauerstoff besonders am Ort der Erythropoetinbildung (FRIED et al., 1956).

2. Die Niere als erythropoetisches Organ

Durch zahlreiche Beobachtungen an Menschen und Tieren wurde nachgewiesen, (GOLDWASSER et al., 1958.; REISMANN und NOMURA, 1962; WALDMAN und ROSSE, 1962) daß die Niere direkt oder indirekt an der Produktion des Erythropoetins beteiligt ist. Dementsprechend werden verschiedene Nierenkrankheiten, wie akutes Nierenversagen, von Anämie begleitet (DEUTSCH et al., 1961) und beim Menschen sind Hypernephrom und Hydronephrose unter Umständen mit einer Erythrozytose vergesellschaftet (COOPER und TITTLE, 1957; FORSELL, 1958). Infolge einer Nephrektomie wurde bei Ratten eine verminderte Erythropoetin Produktion beobachtet, nachdem die Tiere verschiedenen Formen von Hypoxie ausgesetzt wurden (JACOBSON et al., 1957). Nach Perfusion von in situ oder isolierten Hundenieren mit Flüssigkeit, der Kobalt zugesetzt wurde, konnte man im Perfusat erythropoetische Aktivität nachweisen (FISHER und BIRCHWELL, 1969). Experimentelle Daten stützen nun die These, daß die Niere nicht ESF sondern den "Renal Erythropoietic Factor" neuerdings Erythrogenin genannt, bildet (GORDON und ZANJANI, 1970; GORDON et al., 1971). Erythrogenin ist dann in Verbindung mit einer noch nicht bestimmten Substanz im Plasma in der Lage, aktiven ESF zu bilden. Wahrscheinlich entsteht diese nicht bestimmte Substanz in der Leber (CONTRERA und GORDON, 1966). Die Existenz von Erythrogenin wurde in Versuchen nachgewiesen, bei denen Erythrogenin aus den leichten Fraktionen der Mitochondrien und Mikrosomen der Nieren gewonnen wurde, welches die Bildung von ESF veranlaßte, wenn es in vitro mit normalem Serum inkubiert wurde (CONTRERA und GORDON, 1966; ZANJANI et al., 1967; GORDON und ZANJANI, 1970). Erythrogenin ist mit den anderen Enzymen der Niere, nämlich Renin und Angiotensin vergleichbar (GORDON et al., 1971): sie wirken auf Protein-Substanzen, haben aber voneinander abweichende

chemische und physiologische Eigenschaften.

3. Extrarenale Produktion des ESF

Die Bedeutung der Leber in erythropoetischen Prozessen ist seit Jahren bekannt. Ob die Leber an der Produktion des ESF beteiligt ist, wurde unter anderem von GORDON (1959) untersucht. Er konnte mit angesäuertem, gekochtem Leberfiltrat von langsam über einige Wochen entbluteten Kaninchen einen stimulierenden Einfluß auf die Erythropoese in normalen Ratten erzeugen. Allerdings konnten andere Experimente diesen Befund nicht bestätigen (BORSOOK et al., 1954, RAMBACH et al., 1960). Neuerdings gab FRIED (1972) einen experimentellen Nachweis dafür, daß ESF unter Umständen in der Leber erzeugt wird, aber in geringerer Menge als in den Nieren. Es zeigte sich, daß zu 80% nephrektomierte und gleichzeitig zu 80% hepatektomierte Ratten nur weniger als 0,03 EESF/ml Plasma erzeugen vermochten, wenn die Tiere einer Hypoxie ausgesetzt wurden. Nach ausschließlicher 80%iger Nephrektomie wurden 0,15 E/ml, nach 80%iger Hepatektomie 0,9 E/ml im Plasma dieser Tiere gefunden. Die Kontrollen zeigten 1,0 E ESF/ml Plasma. STUCKEY et al. (1972) konnten erythropoetische Aktivität sowohl bei einem "chirurgisch anephrischem" Mann als auch bei einem ernsthaft oligurischem (d.h. "funktionell anephrischem") Mann nachweisen, wenn der Stimulus, ESF (extra-renal) zu produzieren, ausreichend groß war. Untersuchungen, ob andere Organe als die Leber ESF produzieren können, waren ohne Erfolg (GORDON et al., 1955; RAMBACH et al., 1957; PILIERO et al., undated; ERSLEV, 1957).

4. Die Wirkung des ESF

Der ESF wirkt direkt auf das Knochenmark, in dem er die Differenzierung und Proliferation von primitiven Stammzellen bis zur Ausreifung zum Erythrozyten steuert (ALPEN und CRANMORE, 1959; REMMELE, 1963; STOHLMAN, 1961a; FLIEDNER et al., 1959;

KUBANEK, 1969). Es wird angenommen, daß das Erythropoetin die determinierten, erythropoetinsensitiven Stammzellen veranlaßt, sich in der erythroiden Reihe zu entwickeln, indem es die Synthese von "Messenger RNS" und Hämoglobin in den Stammzellen vermittelt. Die Reifung und Proliferation der erythroiden Entwicklungsreihe wird weiterhin beeinflußt von einer kontinuierlichen Produktion von DNS-Hämoglobin (FISCHER, 1962; LOBUE und GORDON, 1967; POWSNER und BERMAN, 1967). Es wird außerdem vermutet, daß ESF auf Knochenmarkstammzellen Einfluß nimmt, die bereits bestimmt sind, sich zu Erythrozyten zu entwickeln statt auf undifferenzierte, d.h. multipotente Knochenmarkstammzellen (BLEIBERG et al., 1966). Von verschiedenen Autoren wird berichtet (STOHLMAN, 1961b; ERSLEV, 1962; HODGSON und ESKUCHE, 1962; HODGSON, 1967), daß Erythropoetin Einfluß auf weitere Stufen der Reifung und Proliferation hat. Schließlich beeinflußt ESF den Ausstoß von reifen Elementen der Knochenmarkstammzellen in den Kreislauf (FISCHER, 1962; GORDON et al., 1962; STOHLMAN, 1962). Auf der anderen Seite wurde angenommen (GORDON, 1959), daß die Wirkung von ESF auf das Knochenmark indirekt sei. ESF würde die metabolische Aktivität in anderen Organen steigern, die metabolischen Produkte würden dann in die blutbildenden Gewebe überführt, um die Produktion von roten Blutkörperchen zu steigern. LAJTHA (1962) weigert sich anzunehmen, daß jeder Wechsel in der erythroiden Entwicklungsreihe als direkter Einfluß des ESF auf das Knochenmark aufzufassen ist. Wenn dieser Wechsel direkt abhängig von der ESF-Aktivität auf das Knochenmark ist, bleibt die Frage, ob dort mehrere erythropoetische Faktoren oder nur ein Faktor für mehrere Aufgaben vorhanden ist.

5. Lagerung und Abbau des ESF

Das Verschwinden von exogenem und endogenem ESF aus dem Plasma der Ratte gibt eine exponentielle Kurve, mit einer Halbwertszeit von einer Stunde (REISSMANN et al., 1965). Der Abbau von ESF findet in der Leber statt; die Stoffwechselprodukte werden

durch die Nieren ausgeschieden (ALPEN, 1962).

6. Chemie des ESF

Obwohl die exakte chemische Struktur noch nicht identifiziert wurde, stimmen die meisten Untersucher überein, daß es sich um ein Glukoprotein handeln müsse, während andere von einem Lipoidcharakter des Erythropoetins sprechen. YU TIN TEY (1938) berichtet von zwei erythropoetischen Faktoren: Der eine, eine hitzestabile, in Alkohol, Aether und Azeton lösliche Substanz, wurde als Lipoid betrachtet; der andere, eine hitzelabile, in Aether unlösliche Substanz, wurde in der Globulin-Fraktion des Serums gefunden.

Aus den Versuchen von RAMBACH, ALT und COOPER (1957) geht hervor, daß die Glukoproteinfraktion des Erythropoetins ein α_2 Globulin ist.

Die erythropoetische Wirkung von 11-Dehydrocorticosteron und Batylalkohol wird von EGLI und KELLER (1956) bzw. LINMAN et al. (1958) bestätigt. Die Annahme, daß das Erythropoetin mit diesen Substanzen identisch wäre, wurde nicht bewiesen. Die Glykoproteinfraktion α_2 Globulin soll fähig sein, den Eisenumsatz zu steigern, die Lipoidfraktion soll ein Ansteigen der Teilung der Normoblasten bewirken (KORST et al., 1968). Diese Annahmen benötigen noch weitere Untersuchungen zur Bestätigung.

7. Anti-ESF und immunologische Eigenschaften des ESF

Der sich im Plasma befindende ESF kann durch Nierenhomogenate inaktiviert werden (FISHER et. al., 1966; ERSLEV und KAZAL, 1968; KURATOWSKA, 1968). Eine Substanz in diesen Homogenaten benötigt für ihre Wirksamkeit ein Kation oder mehrere Kationen (ZANJANI et al., 1967; ERSLEV und KAZAL, 1968; ESSERS und MANN, 1971). ERSLEV und KAZAL (1968) berichten von einer anderen Substanz, die aus den Nieren und auch aus anderen Organen isoliert wurde. Nach diesen Befunden besteht die

Möglichkeit, daß der ESF intra- und extra-renal in Lipiden gespeichert wird und durch eine Serum-Substanz, die durch Hypoxie entsteht, mobilisiert wird.

Es ist bekannt, daß der sich im Plasma befindende ESF immunologische Eigenschaften besitzt, da die erythropoetische Wirkung des ESF durch anti-ESF Serum aufgehoben werden kann (ZANJANI et al., 1968). Diese immunologischen Eigenschaften sind für den ESF charakteristisch (SCHOOLEY et al., 1970; GORDON et al., 1971), d.h., die Bindungsstellen der Serums substanz und des anti-ESF verbinden sich erst nach der Reaktion der Serum-Substanz mit Erythrogein. Auch mit Hilfe der "Hämagglutinations-Inhibitions (HAI)-Technik" war es möglich, die immunologischen Eigenschaften des ESF nachzuweisen (MC DONALD et al., 1969; LANGE et al., 1969).

TEIL II

VERSUCHSANORDNUNGEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ERYTHROPOESE

Die Entwicklung einer genügend empfindlichen Versuchsanordnung, welche die Anwesenheit des ESF hinreichend genau aufzeigt, ist wichtig, um die Untersuchungen der Erythropoese zu fördern. Die meisten bisher angewandten Methoden zur Untersuchung der Erythropoese wurden in vivo durchgeführt, doch wurden einige Versuche unternommen, in vitro-Methoden für diesen Zweck anzuwenden (FISCHER, 1962; KORST et al., 1962; MATOTH, 1962).

1. Biologische in vivo Versuchsanordnungen

Aus in vivo-Experimenten wurde erkannt, daß normale Tiere nicht schnell auf exogenen ESF antworten, insbesondere wenn nur geringe Mengen vorhanden sind (GARCIA und VAN DYKE, 1959). Die Empfindlichkeit des Versuches steigt wesentlich an, wenn diese Tiere eine geringe Produktion von endogenen ESF zeigen (FRIED et al., 1957; GARCIA und VAN DYKE, 1959; GORDON und WEINTRAUB, 1962). Dies kann auf vier verschiedenen Wegen erreicht werden (GORDON und WEINTRAUB, 1962; REMMELE, 1963):

- a. Herabsetzung des Körpermetabolismus durch Mangel an Hormonen (KORST und BETHELL, 1958) oder Hunger (HODGSON et al., 1958; SCHLEUTER et al., 1960; HANSEN, 1963).
- b. Anstieg des O_2 -Gehaltes im Gewebe durch Erhöhung des Sauerstoffgehaltes der Atemluft oder durch Übertransfusion (Polyzythämie) (FRIED et al., 1957; GORDON et al., 1959; GANZONI, 1970).
- c. Teilweise Funktionshemmung des Knochenmarks durch Bestrahlung (BAXTER et al., 1955; LAJTHA und SUIT, 1955; STOHLMAN und BRECHER, 1956; STOHLMAN, 1961b; ESKUCHE und HODGSON, 1965); oder Nitrogen-"mustard" (KORST und BETHELL, 1958).

- d. Sauerstoffmangel-Atmung und die darauf folgende gedrosselte Erythropoese bei normalem Druck (COTES und BANGHAM, 1961; GORDON und WEINTRAUB, 1962).

2. In vitro-Versuchssysteme

Es besteht ein Bedürfnis für die Entwicklung eines in vitro-Versuchssystems um die in vivo-Systeme wenigstens teilweise zu ersetzen. In vitro-Versuche sind zur Erforschung der Eisenverwertung in der Hämsynthese durch Fe 59-Aufnahme mittels inkubierter Knochenmarkzellen möglich geworden und stehen jetzt zur Verfügung (ERSLEV, 1962; MATOTH, 1962; POWSNER und BERMAN, 1967).

3. Immunbiologisches Versuchssystem

Die Tatsache, daß die angestiegenen ESF-Werte mit Serum von Kaninchen neutralisiert werden können, die mit einem menschlichen Erythropoetinextrakt immunisiert wurden, gab Anlaß zu Optimismus in Bezug auf die Entwicklung immunbiologischer Versuchsmethoden (GARCIA und SCHOOLEY, 1963).

Experimente und Ergebnisse

1. In den biologischen Versuchsanordnungen verwendete Tiere

a. Hungernde und hypophysektomierte Tiere

Nach viertägigem Hungern zeigten Ratten eine niedrige "Fe 59 Aufnahme" (HODGSON et al., 1958) als Folge einer gehemmten Erythropoese. Diese Tiere waren empfindlicher gegenüber exogen zugeführtem Erythropoetin als normale Ratten. GORDON und WEINTRAUB (1962) fanden die Fe 59 Inkorporation bei hungernden Ratten zu 5,14% und bei hungernden Ratten, denen anämisches Schaf-Plasma, das 5 bzw. 10 Kobalteinheiten entsprach, verabreicht wurde, zu 13,0% bzw. 19,8%. Zum Vergleich konnten GARCIA und VAN DYKE (1959) eine Verdoppelung der Fe 59-Inkorporation nur nach 16maliger

Vergrößerung der ESF-Dosis erhalten. KEIGHLY (1962) konnte bei hungernden Ratten mit 3 ml anaemischen Kaninchenplasma 28,1% und bei normalen Ratten 4,5% "Fe 59-Inkorporation" erreichen.

Hypophysektomierte Tiere wurden 8-15 Tage nach der Operation verwendet (GORDON, 1959; GORDON und WEINTRAUB, 1962).

b. Polyzythämische Tiere

Polyzythämie wird durch eine Übertransfusion von Erythrozyten erreicht. FRIED et al., (1957) erzeugten einen polyzythämischen Zustand bei gesunden männlichen Ratten durch eine i.p. Injektion von 2 ml Erythrozyten über 8 Tage. Der Hämatokrit stieg von 45 auf 75%. Messungen der Fe 59-Inkorporation zeigten, daß die Tiere auf bis zu 0,05 Einheiten ESF ansprachen.

c. Das hypoxische-polyzythämische Tier

Bei dieser Methode wird die Erythropoese, nicht wie bei den erwähnten Methoden gehemmt, sondern durch Hypoxie gesteigert. Nach der Rückkehr der Tiere zum normalen atmosphärischen Druck nimmt die Erythropoese schnell ab. Der schnelle Abfall beruht auf der stark vermehrten Produktion von Erythrozyten während der Hypoxie. Diese große Anzahl von Erythrozyten wirkt bei normalem Druck als negatives "feedback" auf weitere Zellproduktion. COTES und BANGHAM (1961) benutzten eine kontinuierliche Hypoxie über 14 Tage. 6 Tage nach der Hypoxie waren die Tiere besonders empfindlich gegenüber exogenen ESF von 0,25 Kobalt Einheiten. WEINTRAUB et al. (1963), ziehen die diskontinuierliche Hypoxie vor (siehe unten).

In eigenen Untersuchungen wurden weibliche, CF-1 Mäuse (20-23 g) nach zweiwöchiger Anpassungsperiode in einer Dekompressionskammer diskontinuierlichem O₂-Entzug, der einer Höhe von 23.000 Fuß (0,42 Atm.) entsprach, über 16 Stunden täglich und über zwei Wochen lang ausgesetzt. Dies wurde mit 150 Tieren jede zweite Woche über zwei Jahre lang ausgeführt. Den Tieren

stand während der ganzen Behandlungsperiode ständig Futter zur Verfügung. 3-4 Tage, nachdem die Mäuse wieder dem normalen atmosphärischen Druck ausgesetzt waren, injizierte ich 0,02-2,0 ESA Einheiten und am fünften Tag 0,5 μ C Fe 59 Chlorid in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Schwanzvene. 43 Stunden nach der Aufnahme von radioaktivem Fe 59 wurden die Fe 59-Inkorporation (%), die Retikulozyten-Anzahl (%) und der Hämatokrit bestimmt. Bei dieser Versuchsanordnung konnten 0,02-0,05 ESA Einheiten gemessen werden. 3-4 Tage nach der Hypoxie war die endogen-ESF Aktivität im Plasma gering, die "Fe 59-Inkorporation" und die Retikulozytenzahl (%) niedrig. Hämatokrit-Werte waren auf 50-75% erhöht.

2. In vitro-Versuchssysteme

Kernhaltige Erythrozyten reifen und vermehren sich beinahe normal in einem in/vitro-System. Es wurde beobachtet, daß die Zuführung von ESF keinen Einfluß auf die Eisenaufnahme von Retikulozyten hatte, aber daß die jugendlichen Formen mit einem Ansteigen der Eisenaufnahme antworteten, die sich in einer Dosiswirkungsbeziehung zeigte (ERSLEV, 1962). (Diese Tatsache trifft bei den in/vivo-Situationen nicht zu, wo die Aufnahme durch Retikulozyten die größere Rolle spielt.) Diese Ergebnisse wurden von POWSNER und BERMAN (1967) und MATOTH (1962) bestätigt, die fanden, daß sich die Haemsynthese in den Knochenmarkzellen als Antwort zum ESF verdoppelte.

3. Immunbiologisches Versuchssystem

McDONALD et al. (1969) konnten mit der Hämagglutinations-Inhibitions-Technik (HAI) die immunologischen Eigenschaften des Erythropoetins bestätigen. Demnach wurde ein Hämagglutinations-Inhibitions-Versuchssystem entwickelt (LANGE et al., 1972), wobei in Vollblut, Serum und Urin bei verschiedenen Tierarten schon Konzentrationen von 0,35 milliimmunochemischen Einheiten (μ iu) (normaler Blutspiegel: 37 ± 22 μ iu ESF/ml) nachgewiesen werden konnten. Die Standardabweichung des Mittelwerts war $\pm 0,001$.

Diskussion

Die hungernde Ratte erwies sich als ein wirtschaftliches und schnelles Versuchsobjekt im Erythropoetinversuch. GORDON und WEINTRAUB (1962) weisen allerdings darauf hin, daß der Wert hypophysektomierter oder hungernder Ratten als Versuchstiere erhöht wird, wenn mehrfach gereinigter ESF getestet wird. Da in diesem Fall die Induktion des endogenen ESF, welchem diese Tiere unterworfen sind, wahrscheinlich nicht auftritt, wenn schlecht gereinigte Extrakte verwendet werden (REMMELE, 1963). Zu diesem Zweck sollte die Bestimmung des Hämatokrits zu den Parametern dieser Versuchsanordnung herangezogen werden. Weiterhin sind tierartliche Unterschiede bei Störungen des endokrinen Gleichgewichtes, oder bei starkem Futterentzug (GORDON und WEINTRAUB, 1962) beobachtet worden, so daß die Ergebnisse unter diesem Aspekt vorsichtig zu beurteilen sind.

Das polyzythämische Tier zeigte sich empfindlicher gegenüber exogenen Erythropoetin als hungernde oder hypophysektomierte Ratten (GORDON und WEINTRAUB, 1962). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist ein höherer Arbeitsaufwand und eine große Anzahl von Tieren, die geopfert werden müssen.

Mehrere Autoren lehnten die Anwendung der sub-lethal bestrahlten Tiere als Empfangstiere für erythropoetinhaltige Präparate ab (GORDON und WEINTRAUB, 1962; REMMELE, 1963). Bei diesen Verfahren wird die Erythropoese unphysiologisch gehemmt und mehrere Organe und Gewebe sind geschädigt. Die bestrahlten Tiere sind gegenüber ESF weniger, oder höchstens gleich empfindlich als hungernde oder polyzythämische Tiere (GORDON und WEINTRAUB, 1962). Die Versuche von KRANTZ et al., (1959), zeigten darüber hinaus, daß die Reaktionsweise dieser Tiere gegenüber ESF sehr unterschiedlich sein kann. Auch das mit Nitrogen-"mustard" behandelte Tier zeigt keine Vorteile und kann als für diesen Zweck ungeeignet betrachtet werden (GORDON et al., 1959).

Die hypoxisch-polyzythämischen Tiere zeigten sich über eine

zweijährige Versuchsperiode als besonders empfindlich und zuverlässig und ließen sich versuchstechnisch einfach handhaben. Die Ergebnisse entsprechen mehr den physiologischen Bedingungen der Tiere, als bei solchen Tieren, denen das Futter entzogen wurde, oder die mit einer Übertransfusion behandelt wurden. Die Tatsache, daß die Tiere während der ganzen Vorbereitungsperiode Futter aufnehmen können, schaltet die unerwünschte, erythropoetische Wirkung unspezifischen Nährmaterials aus, ein ganz entscheidender Einwand gegen die hungernahe und hypophysektomierten Tiere (GORDON und WEINTRAUB, 1962; REMMLE, 1963).

Die Fehlerquellen bei dem in vitro-Versuchssystem liegen wohl dort (MATOTH, 1962):

- a. Es ist schwierig, eine gleichmäßige Verteilung von Knochenmarkszellen herzustellen.
- b. Es tritt ein Verlust von Fe 59 mit jeder folgenden Reinigung auf.
- c. Es ist fragwürdig, wie die Aufnahme von Fe 59 überhaupt vor sich geht.

Trotz der Fehlerquellen dieser Experimente hofft man, daß als ihr Nebenprodukt ein genaues in vitro-System für die Erfassung der erythropoetischen Aktivität entwickelt werden kann.

Das HAI System ist 1000 mal empfindlicher als die gegenwärtigen biologischen Versuchssysteme und sowohl für Massenversuche als auch für klinische Laboratorien geeignet.

Kobalt und ESA als Vergleichsstandard

Da eine große Zahl von Versuchen, die sich mit ESF beschäftigen, ausgeführt wurden, wurde ein Standard für alle Laboratorien benötigt, um mit diesem Versuchssysteme für die Erythropoese vergleichen zu können.

Experimente und Ergebnisse

Kobalt ist bekannt, erythropoetische Eigenschaften zu haben (KORST und BETHELL, 1958; SCHLEUTER et al., 1960; WALTERS, 1970). Eine einmalige Injektion von Kobalt-Chlorid in einer Menge von 5-10 Mikromolen führte zu einer signifikant höheren Aufnahme von radioaktivem Eisen bei hungernden Ratten gegenüber den Kontrollen mit physiologischer Kochsalzlösung (SCHLEUTER et al., 1960). So wurde durch Kobalt eine Polyzythämie herbeigeführt, indem man 2 mg Kobalt i.p. über 25 Tage injizierte (KORST und BETHELL, 1958). Die Verwendung von Kobalt hat die Aufnahme von Fe^{59} bei normalen und hypophysektomierten Mäusen gesteigert. Eine Splenektomie und Cystein oder Hystidin hatten keinen Einfluß auf die Kobaltaplikation. Die Standard-Abweichung ist geringer bei hypophysektomierten Tieren und die Eisenverwertung ist höher bei der Gruppe, die mit Kobalt behandelt wurde, als bei der Kontrollgruppe (KORST und BETHELL, 1958).

Diskussion

Im Hinblick auf die oben beschriebenen Eigenschaften war Kobalt in der Lage, den benötigten Standard zu liefern. Eine Einheit von ESF wurde zu einer Menge Erythropoetin in Beziehung gesetzt, die denselben Grad von Eisen (Fe^{59})-Inkorporation verursacht wie 5 Mikromole Kobaltionen (SCHLEUTER et al., 1960).

Für die Erythropoese-Studien mit Fe^{59} und für Vergleiche zwischen Laboratorien, kann ESF Stufe 3 verwendet werden (SCHLEUTER et al., 1960). Dieser Vergleich kann mit Schafplasma-ESF angestellt werden, welcher eine Stärke von einer Einheit pro mg Protein hat. Neuerdings steht ein Extrakt, der aus anämischen Schaf-Plasma gewonnen wird, zur Verfügung. Die Bezeichnung ist "Erythropoetin Standard A" (GORDON und WEINTRAUB, 1962). Diese Entwicklung macht es möglich, ESF als Standardwert für Erythropoetin einzusetzen, was eine Verbesserung gegenüber der Benutzung von Kobalt bedeutet.

TEIL III

DIE ANWENDUNG VON FE 59 ZUR UNTERSUCHUNG DER FERROKINETIK UND ERYTHROPOESE

Die Anwendung radioaktiven Eisens in der Hämatologie wurde von HAHN et al. (1939), anlässlich einer Studie zum Eisenstoffwechsel bei Anämie eingeführt. Es verging allerdings beinahe ein Jahrzehnt ehe Fe 59 Präparate von hoher spezifischer Aktivität zur Verfügung standen und man Spuren der Isotope für eine genaue quantitative Analyse applizieren konnte, ohne daß das physiologische Gleichgewicht gestört wurde. (HUFF, 1951)

Das Verständnis und die Aufklärung ferrokinetischer Prozesse mit Hilfe der Fe 59 Tracer-Technik machte eine spätere Verwendung dieses Isotopes zum Studium der Erythropoese möglich.

A. Eigenschaften, Applikation und Dosierung des Fe 59

1. Physikalische und chemische Eigenschaften

Fe 59 wird bei Beschuß mit Gamma-Strahlen von Fe 58 Isotopen mit Deuterium ($\text{Fe } 58 + \text{H}_2 \longrightarrow \text{Fe } 59$) als das magnetisch angereicherte Fe 58 gebildet (HAHN et al., 1939). Es hat eine Halbwertszeit von 44,5 Tagen und zerfällt mit der Ausstrahlung von Beta- und Gamma-Strahlen niedriger Energie: $\text{Fe } 59 \longrightarrow \text{Co } 59 + \text{Energie}$. Für die Zählung des Zerfalls wird entweder ein Geiger-Müller Zähler oder ein Brunnentyp eines Flüssigkeits-Szintillations-Zählers benutzt (HAHN et al., 1939; HEVESY, 1948; FRANCIS et al., 1959).

Im Handel verfügbare Ferri-Chlorid (FeCl_3)-Präparate enthalten ungefähr 30 $\mu\text{C/ml}$ mit einer spezifischen Aktivität die größer als 10mC/mg Eisen ist (hohe spezifische Aktivität). Benzyl-Alkohol (0,9%) wird als Konservierungsmittel hinzugefügt und zur pH-Wert-Einstellung Natriumhydroxyd oder Salzsäure benutzt. Ferro-Sulfat oder Ferro-Zitrat stehen bei gleicher spezifischer

Aktivität ebenfalls zur Verfügung (STOHLMAN, 1966). Eine Auswertung von Fe 59-Chlorid, Fe 59-Zitrat und Fe 59-Globulinkomplex wurde von MONTI (MONTI et al., 1963) vorgenommen. Eisenchlorid und Eisenzitrat erwiesen sich als auswechselbar und beide benötigten keine Inkubation mit dem Plasma. Der Eisenglobulinkomplex erbrachte ein unterschiedliches Ergebnis, was darauf hinweist, Ergebnisse mit im Handel erhältlichen Globulinkomplexen mit Vorsicht zu werten.

2. Fe 59 als Tracer

Fe 59 erfüllt alle Voraussetzungen (FRANCIS et al., 1959), die von einem guten "tracer" gefordert werden:

- a. Fe 59 wird in das Hämoglobin inkorporiert und kann intravenös für die sofortige Verwertung verabreicht werden.
- b. Fe 59 knüpft sich fest an das Hämoglobin-Molekül und verbleibt bis zum Absterben in den Erythrozyten (ALPEN und CRANMORE, 1959),
- c. Die Menge, die aus dem ursprünglich eingeführten Fe 59 nach bedeutender Verdünnung in den Zellen zurückbleibt, ermöglicht noch genaue Bestimmungen (LAMERTON et al., 1959, ALPEN und CRANMORE, 1959).
- d. Die Halbwertszeit von Fe 59 erlaubt mit 44,5 Tagen alle Messungen die in Frage kommen und verursacht keine Abnormität im normalen Hämoglobinmechanismus (FINCH, et al., 1949).
- e. Fe 59 wird ein Bestandteil der ausgereiften Erythrozyten und ermöglicht damit das Studium der Entwicklung und des Lebens der Erythrozyten von der kernhaltigen bis zur kernlosen Form.

3. Applikation und Dosierung des Fe 59

Bevorzugt wird Fe 59 in physiologischer Kochsalzlösung (MIRAND und PRENTICE, 1956; ARDAILLOU et al., 1960) oder in Citrat-physiologischer Kochsalzlösung (FRIED et al., 1956; FRIED et al., 1957; KRISS et al., 1959) verabreicht und intravenös evtl. intrakardial injiziert (PLZAK et al., 1955; STOHLMAN und BRECHER, 1956;

MIRAND und PRENTICE, 1956; KRISS et al., 1959; ARDALIOU et al., 1960). Für Ratten wird meist eine Dosis von $1\mu\text{C}$ und für Mäuse eine Dosis von $1/2\mu\text{C}$ verwendet. Für größere Labortiere schwankt die Dosis zwischen 5-10 μC (STOHLMAN et al., 1955; KRISS et al., 1959).

B. Ferro-kinetische Prinzipien und ihr Verhältnis zur Erythropoese

1. Resorption von Fe 59 aus dem Darm und Faktoren, die die Resorption des Eisens beeinflussen

Aufgenommenes 3wertiges Ferrieisen wird durch die Magensalzsäure gelöst, ionisiert und zum 2wertigen Ferroeisen reduziert. Es wurde nachgewiesen, daß das Ferroeisenion unterhalb eines pH-Wertes von 5 stabil und gegen die Oxydation zum Ferrieisenion geschützt ist (GRANICK, 1949). Damit ist zu erklären, daß die Resorption in den unteren Abschnitten des Magen-Darmkanals hauptsächlich im Zottenepithel des Duodenums erfolgt. Die Resorption scheint ein aktiver Transportvorgang zu sein (DOWDLE et al., 1960). Bestimmte reduzierende Substanzen wie z.B. Zystein und Ascorbinsäure begünstigen die Resorption des Eisens (BRISE und HALLBERG 1962), neben ihrem reduzierenden Effekt auch dadurch, daß sie mit den Eisenionen Komplexe bilden. Bei der Resorption dieser Substanzen wird Eisen in das Epithel eingeschleust (BRÜSCHKE, 1964). In der Mucosazelle vereinigt es sich bei gleichzeitiger Oxydation mit dem hier gebildeten Apoferritin. Bei Bedarf wird das Ferritineisen reduziert, aus dem Apoferritin-Eisen-Komplex entlassen und in den Kreislauf abgegeben (GRANICK, 1949; POLLYCOVE, 1967).

Die folgenden Faktoren beeinflussen die Resorption des Eisens:

- a. Der Grad der Erythrozytenbildung und Hypoxie
- b. Der Sauerstoffvorrat des Blutes
- c. Der Grad der Ferritinbildung
- d. Der "gastrische Faktor"
- e. Menge des zugefügten Eisens

2. Transport des Fe 59 im Plasma

Das Blutplasma stellt ein Medium dar, in dem sich Eisen in einem ständigen Fluß befindet. Obwohl das Plasmaeisen einen relativ kleinen Anteil des Gesamteisens des Körpers darstellt, kann es

als Brennpunkt des Eisenstoffwechsels angesehen werden, wie LAJTHA (1961) zeigt (Abb. 1).

Das durch Resorption oder aus Stoffwechselreserven oder nach einer i.v. Injektion in das Plasma eingetretene Eisen wird an Transferrin gebunden (BRÜSCHKE, 1964; HOSAIN und FINCH, 1964) und in der Reihenfolge zwischen Plasma und erythropoetischem "label pool" (GREENBERG und WINTROBE, 1946), zwischen Plasma und zellulären Hämenzymen und Myoglobin sowie zwischen Plasma und im Gewebe liegenden Eisenreserven ausgetauscht (POLLYCOVE, 1967).

Transferrin, das ein guter Träger für Eisen ist, ist ein Plasmaprotein, welches in der Cohn-Fraktion IV-7 des Plasmas angetroffen wird; es hat die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit des beta-1-Globulins. Eine eisentragende Einheit kann 2 Ferriatome pro Molekül binden. Die 8g, die sich im Plasma befinden, enthalten 3,5 mg Eisen bei einer Konzentration von 120 Mikrogramm/100 ml, d.h. es ist nur 1/3 der Kapazität abgesättigt. Demnach ist im Plasma eine latente Eisenbindungskapazität von 230 Mikrogramm/100 ml vorhanden. Der Gehalt des Plasmas an Eisen ist von der Bildung, dem Auftreten sowie dem Austritt des Transferrins abhängig (POLLYCOVE, 1967).

3. Transport des Fe 59 in die Vorstufen der Erythrozyten

Das an Transferrin gebundene Eisen wird im Knochenmark zur Hämoglobinsynthese nur durch die kernhaltigen Vorstufen der Erythrozyten und Retikulozyten aufgenommen. Transferrin-Moleküle werden sehr schnell an den Membranen der Erythrozyten gebunden (HAHN et al., 1939), wobei ein Mechanismus dafür besteht, damit Eisen direkt in die Erythrozyten gelangt (LAJTHA, 1961). Transferrin spaltet dabei sein Eisen ab und das Protein kann weiteres Eisen aufnehmen (PAOLETTI und DURAND, 1958; BROWN, 1963; JANDL und KATZ, 1963; MORGAN, 1964). Radioaktives Eisen wurde eingesetzt zur besseren Klärung dieses Mechanismus.

Ein anderer Mechanismus, womit Eisen in die Erythrozyten transferiert wird, ist die Ropheozytose, eine besondere Art von Phagozytose. Sie wurde von POLICARD und BESSIS (1958) und von BESSIS (1959) elektronenmikroskopisch studiert und beschrieben: Im Knochenmark sind Erythroblasten-Inseln vorhanden. Retikulozyten, die Ferritin-Moleküle und Hämosiderin enthalten, wirken als Nährzellen und transferieren ihre Ferritin-Moleküle an Erythroblasten. Zuerst haften sich Moleküle an die Zellmembran. Durch eine nicht größer als 500 Å messende Einstülpung der Zellmembran und gleichzeitige Schließung der Ränder der Einstülpung entsteht eine Vakuole, die die Ferritin-Moleküle enthält. Durch die nachfolgende Auflösung der Wand der Vakuole verschwindet allmählich die Vakuole, wobei die Moleküle in das Zytoplasma gelangen.

4. Fe 59 Aufnahme durch Vorstufen roter Blutzellen und Retikulozyten zur Hämoglobin-Synthese

Die Häm-Synthese wird sowohl in kernhaltigen roten Blutzellen als auch in Retikulozyten beobachtet, nicht aber in reifen roten Blutzellen (LAJTHA und SUIT, 1955, BROWN, 1963).

Experimente und Ergebnisse

1. MENDEL (1961) erforschte die Zusammenhänge zwischen dem Grad der Erythrozytenbildung, der Hypoxie und der gastrointestinalen Eisenresorption mittels juveniler CF-1 Mäuse. Vor den Experimenten wurden die Mäuse splenektomiert. Die Ergebnisse zeigten, daß das Erythropoetin befähigt ist, die Eisenresorption zu fördern, jedoch war diese Wirkung indirekt und von der Fähigkeit, die Erythrozytenbildung zu beschleunigen, abhängig. Dieser Befund wurde auch von GALLAGHER (1962) und von REYNAFARJE und RAMOS (1962) bestätigt. Allerdings konnte nach MENDEL (1961) eine gesteigerte Eisenresorption auch allein durch Hypoxie bedingt sein und ohne gesteigerte Erythropoese ablaufen. In einem

weiteren Experiment wendete WEINTRAUB et al. (1965) die Hypoxie an und erzeugte bei männlichen Albino-Ratten eine Polyzythämie bei einer simulierten Höhe von 20,000 ft. (6.096 m) für 7 Tage. Als die Tiere auf Normaldruck zurückgebracht wurden, wurde die Erythropoese gesenkt, während sich gleichzeitig die Eisenresorption verminderte und die Eisenspeicherung im Darm zunahm.

2. Bei vermehrtem Körpervorrat nahm die normale Resorptionsrate ab, bzw. bei vermindertem Körpervorrat zu (MOORE, 1957, BOTHWELL et al., 1958; PIRZIO-BIROLI und FINCH, 1960). Gleichzeitig setzte die Aufnahme einer genügenden Eisenmenge die Resorption von weiterem Eisen aus der Nahrung bei Mensch und Hund für 6-24 Stunden herab. Dies wird von POLLYCOVE (1967) als "Schleimhautblock" gekennzeichnet. Der "gastrische Faktor" erhöht die Eisenresorption, wenn gleichzeitig Magensaft anämischer Hunde mit Fe 59 an gesunde Hunde verabreicht wird (POLLYCOVE, 1967).

3. POLLYCOVE (1967) hatte den Einfluß des Depoteisens, der Erythropoese und der Eisen-Abgabe (release) aus dem Retikuloendothelialen-System (RES) auf die Plasmakonzentration untersucht, und folgende Ergebnisse erhalten:

- a. Das Depot-Eisen: War der Anteil an Depot-Eisen gering oder überhaupt nicht vorhanden (Eisenmangelanämie), so war der Gehalt an Plasmaeisen im Blut hoch; bei Hämachromatosis fiel der Anteil des Plasmaeisens trotz hoher Depoteisenvorräte ab.
- b. Erythropoese: Bei erhöhter Erythropoese infolge Erythrozytenzerfalls (z.B. akuter Hämorrhagie oder während der Behandlung einer perniziösen Anämie) stieg der Gehalt an Plasmaeisen an. Bei geringer Erythropoese (z.B. bei aplastischer oder hypoplastischer Anämie) war auch nur ein geringer Plasmaeisenspiegel vorhanden.
- c. Übertritt des Eisens in das Blut aus den Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES): Wenn der Grad des Übertretens von Eisen aus dem RES ins Blut gebremst wird (bei akuten und

chronischen Infektionen und bei entzündlichen Prozessen), so steigt der Anteil von Plasmaeisen im Blut. Bei hämolytischer Anämie z.B. tritt eine Beschleunigung des Übertretens des Eisens ein und somit fällt der Gehalt an Eisen ab.

4. Bei einem in vitro Versuch an Blut (Mensch) (FLETCHER und HUEKUS, 1967) verhielt sich die Eisenaufnahmemenge der Retikulozyten direkt proportional zum Eisensättigungsgrad des Plasmas, d.h. daß die Retikulozyten Fe 59 vorzugsweise von den zwei Eisenatome tragenden Transferrinmolekülen aufnahmen. Aber bei Sättigung des Plasmas mit nicht radioaktivem Eisen war die Eisenaufnahme zum Zeitpunkt der Fe 59-Zugabe umgekehrt dann höher, wenn der Sättigungsgrad niedriger war. Daraus geht hervor, daß einige Eisenbindungsstellen bevorzugt Eisen an die Retikulozyten liefern. Dieser letztere Befund wurde in vivo bei Patienten sowohl mit inaktiver als auch mit gesteigerter Erythropoese bestätigt (FLETCHER und HUEKUS, 1967; FLETCHER und HUEKUS, 1968). In Fällen mit überaktiver Erythropoese wird das Eisen bestimmten bevorzugten Stellen zuerst entnommen.

5. Autoradiographische Studien an jungen Ratten ergeben, daß die Aufnahmerate von radioaktivem Eisen bei den verschiedenen Entwicklungsstadien der Erythrozytenvorstufen, vom frühen Normoblasten aufwärts bis zu den polychromatischen Stadien, die gleiche ist. Diese Untersuchungen zeigen auch Eisenaufnahme bei den Pronormoblasten, aber in wesentlich langsamerer Form (RAMBACH et al., 1955; FRANCIS et al., 1959; BROWN, 1963). Bei einem Rattenversuch in vivo wurde die Fähigkeit transfundierter Retikulozyten, Eisen zu assimilieren, untersucht (DONATI, 1966). Die mit einer 20%igen Retikulozytentransfusion versehenen Tiere zeigten 2 und 6 Stunden nach der Fe 59-Injektion weit höhere Aufnahmeraten. Der Serumeisenspiegel und die Plasmaeisen-Halbzeitwerte waren bei diesen Tieren gering im Verhältnis zur gesteigerten Eisenaufnahme der Retikulozyten.

Diskussion

Die Nutzung des Eisens für die Erythropoese steuert den Eisengehalt der Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes. Der Eisengehalt bestimmt seinerseits jedoch auch die Fähigkeit der Epithelzellen zur Eisenresorption aus dem Darmlumen.

Der Sauerstoff-Vorrat kann ebenfalls als regulierender Faktor wirken (SAUER et al., 1969). Die Darmschleimhaut weist einen sehr aktiven aeroben Stoffwechsel auf. Eine Verminderung des O_2 -Vorrats infolge eines niedrigen O_2 -Gehaltes im Hämoglobin führt zur Abnahme der Eisen-3-Ionen im Ferritin 3 um zweiwertiges Eisen zu formen, welches dann in das Blut übergeht (POLLYCOVE, 1967).

Der Schleimhaut-Block (POLLYCOVE, 1967) kann entweder durch die Absättigung der Mukosazellen mit Eisen oder durch eine zunehmende Menge von Fe 59 mit niedriger spezifischer Aktivität, welches den Resorptionsgrad für "inaktives" Eisen senkt, erklärt werden.

Es wird angenommen, daß Ferritin eine wichtige Rolle spielt (WÖHLER, 1959; CALLENDER, 1967). Das Eisen des Ferritins steht mit dem zweiwertigen Eisen (Fe^{++}) der Zellen in einem Gleichgewicht und je mehr Ferritin gebildet wird, desto mehr besteht die Tendenz, das zweiwertige Eisen an den Zellen im Grad der Absättigung zu halten. Dadurch wird der Eintritt von weiterem Eisen aus dem Darmkanal gehemmt und auch die Übertragung des zweiwertigen Eisens aus den Zellen auf das Blutplasma erleichtert (CALLENDER, 1967). Wiederholte Experimente bewiesen, daß man die Existenz eines "gastrischen Faktors" bei anämischen Hunden annehmen darf (KOEPEKE und STUART, 1964). Es ist möglich, daß Eisen in ähnlicher Weise wie Vitamin B_{12} resorbiert wird - d.h., für die Eisenresorption könnte ein "intrinsic factor", der vom Magen sezerniert wird, notwendig sein.

Die Eisenresorption nimmt mit Steigerung der durch die Nahrung

zugeführten Menge zu, gleichzeitig nimmt sie jedoch prozentual ab.

Alle diese Faktoren beeinflussen den Plasmaeisengehalt in der Weise, daß sie sich auf den Übertritt von Eisen ins Blut beziehen. Allerdings muß bemerkt werden, daß dieser Gehalt in dem Maße davon abhängig ist, inwieweit das Knochenmark das Eisen benötigt. Eine weitere Abhängigkeit besteht von der ungesättigten Eisenbindungskapazität des Transferrin. Zum Beispiel kann bei schweren Haemolysen der Gehalt an Plasmaeisen unverändert bleiben infolge eines gesteigerten Plasmaeisentransports (PETR) GORDON. Die Aufgabe, die klinischen Befunde über den Gehalt an Plasmaeisen genau zu interpretieren, wird durch die Tatsache weiter kompliziert, daß bei niedrigem Gehalt die Gesamt-Eisenbindungskapazität (TEBK) hoch und der prozentuale Anteil der Plasmaeisensättigung niedrig ist (POLLYCOVE, 1967). Dieses gegenseitige Wechselspiel ist besonders bei Eisenmangelanämien so empfindlich, daß vor Absinken des PE-Gehaltes unter die normale Konzentration ein abnorm niedriger Sättigungsgrad entsteht. Als Ausnahmen werden Infektionen, Entzündungen oder "bösartige Erkrankungen" angesehen, bei denen sowohl die PE-Konzentration als auch die Gesamt-Eisenbindungskapazität (TEBK) stark vermindert erscheint.

Die Feststellungen über die Ropheozytose sind von einigen Untersuchern bestätigt worden, zit. nach GANZONI (1970), aber die genaue Bedeutung dieses Systems ist in Frage gestellt worden (LAJTHA et al., 1959; GANZONI, 1970). Nach BROWN (1963) ist es möglich, daß das Transferrin eine dominierende Rolle spielt und daß die Ropheozytose eine größere Bedeutung bei einer Hä-molyse im Knochenmark erlangt.

Die Frage nach dem Sitz der Hämoglobinsynthese innerhalb des Retikulozyten kann dahingehend beantwortet werden, daß die Hämoglobinbildung ein zytoplasmatischer Prozeß ist und nicht an eine besondere Substanz der Retikulozyten gebunden ist (ERICKSEN, 1957), d.h., daß das Hämoglobin der Mikrosomen

keine Vorstufe des zytoplasmatischen Hämoglobins sein kann. Bestätigt wird dies durch den Befund von GOODMAN und HALL (1967), daß die Anhäufung abnorm großer Eisenmengen in den Mitochondrien der Erythroblasten und Retikulozyten durch verminderte Porphyrinbildung erklärbar ist.

C. Methoden und Parameter für das Studium der Erythropoese
die bei Verwendung von Fe 59 erhalten werden können

Durch die Injektion oder per orale Verabreichung von Fe 59 wird der Plasmaeisen-vorrat markiert und man kann den Weg des radioaktiven Eisens durch mehrere Messungen erfassen und die Mechanismen oder den Status der Erythropoese direkt oder indirekt darstellen. Die folgenden Parameter können bei Gebrauch von Fe 59 gemessen werden:

1. Resorptionsmessungen mit Fe 59

Das Ziel dieser Messungen ist es, den Anteil des resorbierten Eisens zu bestimmen, welcher während der Erythropoese eine Rolle spielt.

2. Plasmaeisen "Clearance" Rate (PECR)

Plasmaeisen "clearance" ist der Anteil des Gesamt-Plasmaeisens, der das Plasma während eines bestimmten Zeitraumes verläßt.

3. Die Messung der Gesamterythropoese: Die Plasmaeisen
Transport Rate (PETR)

Die PETR ist das gesamte in das Plasma ein- bzw. austretende Eisen pro Tag und im allgemeinen wird sie als das bedeutendste Maß der erythropoetischen Aktivität des Knochenmarkes betrachtet (HAHN et al., 1942; HUFF et al., 1950; LAJTHA, 1961; PRIBILLA, 1964).

4. Messung der wirksamen Erythropoese: Inkorporation des Fe 59
in die peripheren Erythrozyten

Mißt man das Erscheinen des radioaktiven Fe 59 in den peripheren roten Blutzellen in Prozent der eingangs injizierten Menge, so erhält man die "Fe 59 Inkorporation", einen der wichtigsten einzelnen Parameter beim Studium der Erythropoese, weil er die

Messung der effektiven Erythropoese ermöglicht (DUBACH et al., 1946; FINCH et al., 1949; LOEB et al., 1955, LAJTHA, 1961).

Experimente und Ergebnisse

1. LAJTHA (1961) schlägt zur Bestimmung des für die Erythropoese notwendigen resorbierten Fe 59 folgende Methode vor:

- a. Zur Bestimmung der Netto-Resorption von peroral appliziertem Fe 59 kann bei menschlichen Patienten folgende Formel angewandt werden:

$$\frac{\text{Zerfälle/min. (Stuhlprobe)} \times 100}{\text{Zerfälle/min/ml (Standard)} \times \text{ml applizierter Lösung}} = \text{Prozentsatz der verabreichten Dosis in jener Stuhlprobe}$$

- b. Um den für die Erythropoese gebrauchten Anteil bestimmen zu können, werden 7-10 Tage nach der letzten Stuhlprobe 10-21 ml Blut entnommen und der radioaktive Zerfall in der Gesamt-Blutprobe ermittelt. Durch eine Blutvolumenbestimmung kann die Gesamt-Aktivität im Blut - von der angenommen werden kann, daß sie die Gesamt-Menge der resorbierten Radioaktivität darstellt - errechnet werden. Der Zeitraum zwischen der Entnahme der letzten Stuhlprobe und der Bestimmung der Gesamt-Aktivität im Blut wurde in dieser Versuchsanordnung deshalb so gewählt, um hinreichend genau abzuklären, ob das gesamte verabreichte Fe 59 entweder vollständig ausgeschieden oder resorbiert wurde.

Die mit dieser Methode erhaltenen Befunde können wie folgt zusammengefaßt werden:

Werte zwischen 20% und 30% können als normale Resorptionsmengen angesehen werden; Resorptionswerte zwischen 50% und 80% werden bei Patienten mit Eisenmangel-Erkrankung erhalten. Der Anteil beträgt in Erythrozyten normaler Untersuchungsfälle 75-85% und 90% bei anämischen Patienten.

2. Bestimmung der Plasmaeisen "Clearance" Rate

Nach Verabreichung von Fe 59 werden 4-5 Blutproben im Abstand von 2-4 Stunden entnommen; die erste Probe jedoch schon 5 Minuten nach Beginn. Gleichgroße Plasmaproben werden im Flüssigkeitscintillationszähler gezählt und die Ergebnisse aufgezeichnet. Der Befund ergibt gewöhnlich eine gerade Linie, wie LAJTHA (1961) zeigt (Abb. 2). Die Zeit, in der die Plasma-Radioaktivität um die Hälfte ihres Ausgangswertes absinkt, wird als "half-clearance"-Zeit bezeichnet, welche bei gesunden, erwachsenen Menschen 60-120 Minuten (HUFF und JUDD, 1956; BOTHWELL et al., 1957) beträgt. Nach einer i.v. Verabreichung verschwindet Fe 59 in normalen Ratten innerhalb 6 Stunden beinahe vollständig aus dem Plasma (RAMBACH et al., 1957).

Eine neue und in der Klinik anwendbare Methode zur Messung der Plasmaeisen Clearance wurde von HÖGLUND et al. (1967) eingeführt. Diese Methode mißt indirekt die Höhe der Plasmaeisen Clearance, wobei das Verschwinden von markiertem Eisen aus der Hand durch einen in vivo Test gemessen wird. Diese Befunde stimmen vollständig mit den an in vitro Untersuchungen erhobenen Ergebnissen der Plasmaeisen "Clearance" überein. Diese gleichlautenden Ergebnisse sind auf die Tatsache zurückzuführen, daß im Knochenmark der Hand keine Erythropoese stattfindet. Diese Methode ist besonders für diagnostische Untersuchungen der Erythropoese brauchbar (HÖGLUND et al., 1967).

3. Bestimmung der Plasmaeisen Transport Rate

Die PETR wird durch das Zählen von Plasmaproben von 2 bis 4 ml in einem "Brunnentyp-Scintillationszähler" vorgenommen. Diese Proben wurden von Menschen vor der Injektion von radioaktiven Eisen 59 entnommen und 3, 10, 30, 60, 180 sowie 300 Minuten danach (LOEFLE, 1955; BOTHWELL et al., 1956; BOTHWELL et al., 1957). Die PETR wird durch Teilung von natürlichem Log von 2 ($= 0,693$) durch die "half clearance"-Zeit berechnet (HUFF et al., 1952; BOTHWELL et al., 1956; LAJTHA et al., 1959; PRIBILLA, 1964).

Diese zeigt den Prozentsatz des stündlich aus dem Plasma entfernten Eisens an. Das ergibt: (HUFF et al., 1952)

$$\text{PETR} = \frac{0,693}{(\text{Fe mg/Tag}) \cdot \text{Fe } 59 \text{ } 1/2\text{t (h.)}} \times \text{mg Fe/cm Plasma} \times \text{Plasma Vol.} \times 24 \text{ h.}$$

$$\text{PETR (Fe mg/Tag)} = 35 \text{ mg Fe/Tag.}$$

Oder, nach der vereinfachten Form von BOTHWELL et al.(1957),

$$\text{PETR (Fe mg/Tag/100 ml plasma)} = \frac{\text{Plasmaeisen (y \%)}}{\text{Fe T1/2 min.}}$$

4. PETR beeinflussende Faktoren

Die Zusammenhänge zwischen den folgenden Faktoren und der PETR wurden von verschiedenen Autoren untersucht und folgende Ergebnisse ermittelt:

- a. Tageszeitliche Schwankungen: Die PETR kann von tageszeitlichen Schwankungen abhängig sein, d.h. daß z.B. am Abend andere Ergebnisse erhalten werden können als am Morgen (PATERSON et al., 1952; BOTHWELL et al., 1956; LAJTHA, 1961). Um die Fehlerquellen auszuschalten, die sich aus der Extrapolation zur täglichen PETR ergeben, sollte stündlich Proben abgenommen werden.
- b. Die Zerstörung der roten Blutkörperchen: Wenn ein verstärkter Abbau der Erythrozyten in Menschen oder in Tieren durch Verabreichung von nicht lebensfähigen Erythrozyten experimentell herbeigeführt wurde, konnte an der PETR keine Veränderung beobachtet werden (BOTHWELL et al., 1956). Die Zerstörung der roten Blutkörperchen an sich scheint daher die PETR nicht wesentlich zu verändern.
- c. Vermehrter Eisenvorrat im Körper: Bei Patienten, die an Hämochromatose litten, bei denen der Eisenvorrat zwanzigmal über dem Normalwert lag, wurde die PETR mit 67% über dem

Normalwert errechnet (BOTHWELL et al., 1956).

- d. Der Grad der Erythropoese: Eine veränderte erythroide Knochenmarkaktivität infolge einer verminderten Erythropoese nach einer Ganzkörper-Röntgenbestrahlung verminderten die PETR beträchtlich (BOTHWELL et al., 1956). (Eine Verminderung der Retikulozytose wurde erst vier Tage nach der Bestrahlung beobachtet.) In ähnlicher Weise wurde die PETR erhöht, wenn die Erythropoese gesteigert wurde. Es scheint daher zwischen dem Grad der Erythropoese und dem der PETR ein direkter Zusammenhang zu bestehen.
- e. Hämatologische Störungen: Es wurde festgestellt, daß die PETR sich bei Polyzythämie, Leukämie, perniziöser Anämie und hämolytischer Anämie (BOTHWELL et al., 1956) vermehrte. Die PETR erwies sich als ein sehr wichtiger Meßwert bei der Diagnose der Polycythaemia vera: (LAWRENCE et al., 1952) nach und während der O₂ Verabreichung zeigten Patienten mit sekundärer Polyzythämie eine 28-35%ige Verminderung der PETR; andererseits wiesen Patienten mit Polyzythämie vera keinen derartigen Rückgang auf.

5. Messung der wirksamen Erythropoese

Experimentell wird der Prozentsatz des von den roten Blutzellen inkorporierten radioaktiven Eisens durch tägliche Blutentnahme bis zum 7. oder 10. Tag nach der Fe 59 Injektion und durch Messung der Aktivität in den Erythrozyten gemessen. Die errechneten Werte werden als Inkorporationskurve dargestellt. Diese Kurve erlaubt, den Verlauf und das Ausmaß der Inkorporation zu verfolgen und deswegen hat sie auch einen diagnostischen Wert.

Ich habe nach der Methode von GORDON und WEINTRAUB (1962) zahlreiche Versuche über eine Zeitspanne von zwei Jahren ausgeführt und die Vor- und Nachteile dieser Parameter werden im folgenden betrachtet und erörtert.

Material und Methode

Als Versuchstier wurden 3-4 Wochen alte, weibliche CF-1 hypo-
xisch-polyzythämischer Mäuse zwischen 20-23 g verwendet.
3-4 Tage nachdem die Mäuse wieder dem normalen atmosphärischen
Druck ausgesetzt waren, wurden an die Tiere in Gruppen zu
je 6 Mäusen Erythropoetin Standard A (s.S.14) von 0,03-0,60
ESA-Einheiten in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p.
injiziert. Am fünften Tag wurde 0,5 μ C Fe 59 in 0,2 ml physio-
logischer Kochsalzlösung pro Tier i.v. (Schwanzvene) verab-
reicht. 43 Stunden nach der Aufnahme von radioaktivem Fe 59
wurde den Tieren unter Aetheranaesthesie je 0,5 ml Blut ent-
nommen, die Brust- und Bauchorgane auf event. pathologische
Veränderungen untersucht und die Tiere durch Drehung des Kopfes
getötet.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

a. Aufnahme von Fe 59

Die Disintegration des radioaktiven Materials in 0,5 ml Blut
wurde in einem Brunnen-Typ Szintillationszähler gezählt und
der Prozentsatz der Fe 59-Aufnahme nach der Gleichung
(HUFF et al., 1952):

$$\% \text{ Fe 59 Aufnahme} = \frac{\text{Zerfälle/min/ml (Zellmasse)} \times 100}{\text{Zerfälle/min - (injiziertes Fe 59)}}$$

berechnet, wobei

$$\text{Erythrozytenvolumen} = \text{Plasmavolumen} \times \frac{\text{Hämatokrit}}{1 - \text{Hämatokrit}}$$

b. Hämatokritwert

Die Hämatokritwerte wurden mit Hilfe der Mikro-Hämatokrit-
methode festgestellt. Die Hämatokritwerte dienten hier als
Maßstab der Polyzythämie und nicht der Erythropoese. Tiere
mit einem Hämatokritwert unter 50 wurden nicht benutzt.

Diskussion

1. Auf Grund der Tatsache, daß nur eine unbedeutende Menge Fe 59 im Gewebe zurückgelassen wird, wurde angenommen (HAHN et al., 1939; DUBACH et al., 1946), daß das von Erythrozyten eingebaute Eisen gleich der Menge des absorbierten Eisens ist. LAJTHA (1961) weist allerdings darauf hin, daß nicht alles nach intravenöser oder peroraler Applikation im Plasma auftretende Eisen sofort zur Erythropoese verwendet wird, sondern ein signifikanter Anteil als Eisenreserve übertritt. Obwohl dieser Anteil bei an Eisenmangel erkrankten Patienten relativ gering ist, ist er bei normalen Patienten groß und genügend variabel, so daß er bei dieser Methode in Betracht gezogen werden muß.

2. Die "Plasma-HALF-Clearance -Zeit" allein hat bei der Untersuchung der Erythropoese nur eine untergeordnete Bedeutung, da nur die Menge des aus dem Plasma entfernten Eisens gemessen wird ohne Rücksicht auf Ursprung oder Bestimmungsort. Außerdem kann die PEER bei hoher Plasmaeisenkonzentration und langer Eisen-"Clearance"-Zeit bzw. bei niedriger Plasmaeisenkonzentration und kurzer Eisen-"Clearance"-Zeit gleich sein (PRIBILLA, 1964). Um diese Methode für hämatologische Untersuchungen sinnvoll anwenden zu können, muß sie mit der Plasmaeisentransportrate und anderen Parametern gekoppelt werden.

3. Die bei der Messung der PETR auftretenden Probleme

Die Berechnung der PETR schließt die Messungen verschiedener anderer Parameter mittels Methoden ein, die innerseits eine Reihe von Fehlern beinhalten. Diese sind die Plasmaeisenkonzentration und die Ermittlung des Plasmavolumens. Diese Fehler stammen aus der Tatsache, daß die infrage kommenden Werte eine Funktion der Umsatzrate des metabolisch aktiven Eisenvorrats darstellen. Wenn diese Rate zunimmt, kann sich ein "Feedback" des Eisens an das Plasma ergeben. In einem solchen Fall ist das Verschwinden

des Eisens aus dem Plasma nicht eine einfache exponentielle Funktion (wie sie es wäre, wenn kein "feedback" stattgefunden hätte), sondern es kann 2 - 3 oder mehr als 3 Komponenten einschließen, was nach 12 - 14 Stunden eine kurvenlineare Funktion ergibt (SHARNEY et al., 1954). Diese verschiedenen Komponenten reflektieren ein "feedback" aus dem retikuloendothelialen System (RES) und aus Eisenvorräten des Gewebes (NAYS et al., 1960). Deswegen ist es erforderlich, die Anfangskomponenten (d.h., die einfache exponentielle Abräumung (Clearance)) von anderen Komponenten (d.h. die angenommene Wiederaufnahme des Eisens) genau zu trennen. Wird dies nicht gemacht, so kann eine Überschätzung der "Plasma-Half-Clearance-Zeit" und somit der PETR entstehen (IAJTHA, 1961; STOHLMAN, 1961b). Nach STOHLMAN (1961b) müssen ferner bestimmte Voraussetzungen getroffen werden, wenn die PETR-Bestimmung durchgeführt wird:

- a. Um die PETR mit der Produktion der roten Blutzellen in Beziehung zu bringen, sollten die Vorstufen der Erythrozyten nur während der Dauer der ersten Komponente des Plasmaeisen-"clearance" gekennzeichnet werden. Sonst wird der maximale Prozentsatz des in den roten Blutkörperchen des Blutkreislaufs erscheinenden Eisens zu hoch geschätzt.
- b. Die PETR und die Hämoglobinsynthese müssen während der Untersuchung konstant bleiben, um die "Plasmaclearance-Zeit", die für irgendeinen 4 bis 8stündigen Zeitabschnitt erhalten wurde, auf einen 24stündigen Zeitabschnitt gültig extrapolieren zu dürfen. Es wird dabei vorausgesetzt, daß es keine tageszeitlichen Schwankungen in der PETR gibt.
- c. Die Bildung und der Zerfall der roten Blutzellen müssen konstant und einander gleichwertig sein, weil jeder deutliche Rückfluß des radioaktiven Eisens während der Anfangsphase der Aufnahme die "Plasma-Clearance-Zeit" verlängern könnte. Diese Voraussetzung trifft zum Beispiel in hämatologischen Störungen nicht zu, bei denen die Zerstörung der roten

Blutkörperchen immer größer als deren Produktion ist.

4. Auswertung der PETR als Messfaktor der Erythropoese

Die PETR kann für die Messung der gesamten Erythropoese angewendet werden. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß das meiste Eisen ($2/3$ bis $3/4$), das das Plasma verläßt, durch das Knochenmark aufgenommen wird. Um genau bestimmen zu können, wieviel von dem durch das Knochenmark aufgenommene Eisen zur Hämoglobinsynthese verwendet wird, und in genau welchem Ausmaß (und in genau welcher Geschwindigkeit), muß die PETR mit den Messungen des tatsächlich in den roten Blutkörperchen des gesamten Kreislaufs vorhandenen Eisens gekoppelt werden. Nicht alle Hämoglobin synthetisierenden Retikulozyten und roten Blutkörperchen treten in den Kreislauf ein: Eine Fraktion dieser gebildeten Elemente stirbt schon im Knochenmark ab, während andere gleich, nachdem sie den Kreislauf erreicht haben, absterben, was zu einer unwirksamen Erythropoese führt (FINCH et al., 1949; BROWN, 1963; FLIEDNER et al., 1969). Die wirksame Erythropoese wird durch die Aufnahme von Fe 59 bei den peripheren Erythrozyten gemessen. Zusammengefaßt ist die Bestimmung der PETR nur eine annähernde Bestimmung der gesamten Erythropoese, die als Hinweis auf die Gesamtproduktion der roten Blutkörperchen benutzt werden kann, weil normalerweise der größte Teil des durch das Knochenmark aufgenommenen Eisens zur Hämoglobinsynthese verwendet wird. Außerdem kann die allgemeine Genauigkeit der PETR Bestimmung infolge der mit Wiederverwendung verbundenen Komplikationen nicht viel besser als $\pm 15\%$ sein. Die für die PETR erhaltenen abweichenden Ergebnisse dürften mit diesem Mangel an Genauigkeit zu erklären sein (LAJTHA, 1961).

5. Bewertung des Prozentsatzes der Fe-59 Aufnahme durch zirkulierende rote Blutzelle als Maßstab für die Erythropoese

Dieser Parameter bietet wichtige Anhaltspunkte über die Geschwindigkeit der Erythrozytenproduktion. Deren Erscheinungsrate

hängt davon ab, wie schnell sie reifen und ins Peripherblut übergehen (LAMERTON et al., 1959).

Die prozentuale Eisenaufnahme hat ähnliche wie andere bei der Untersuchung der Erythropoese auftretende Parameter Fehlerquellen und schließt Ungenauigkeit ein: da sie allein keine Aussage über die Funktion des Knochenmarks gibt, erlangt die prozentuale Eisenaufnahme nur dann besondere Aussagekraft, wenn sie mit anderen Parametern, im besonderen mit der PETR, verbunden wird.

Es ist notwendig, darauf hinzuweisen, daß die Methode nicht so einfach ist, wie sie anfangs scheinen mag und wenn die Komplikationen, die diese Methode einschließt, nicht genügend beachtet werden, können ungenaue Untersuchungsergebnisse die Folge sein. Frühere Untersucher interpretierten irrtümlicherweise hohe oder niedrige Fe-59-Aufnahme in den zirkulierenden Erythrozyten als Beweis einer hohen oder niedrigen Erythrozyten-Neubildung (HAHN et al., 1942). Diese Annahme ist richtig, wenn die Erythropoese bei gesunden Menschen und Tieren untersucht wird, die keinen äußeren oder inneren Einflüssen ausgesetzt sind, d.h., die Neubildung von Erythrozyten und alle Faktoren, die wesentlich zur Bestimmung der Erythropoese sind, (z.B. PETR, Plasmaeisen-Konzentration, Plasma-Volumen), unverändert sind. Diese Faktoren unterscheiden sich bei gewissen haematologischen Erkrankungen. So kann z.B. bei Polyzythämie die Aufnahme normal sein (80%), die Neubildung von Erythrozyten hingegen gestört sein, und daher die zusätzliche Berechnung der prozentualen Eisenaufnahme in Erythrozyten, durch die PETR besondere Bedeutung erlangen.

Experimentelle Ergebnisse zeigten (DUBACH et al., 1946; FINCH et al., 1949, BOTHWELL et al., 1956; LAJTHA, 1961), daß der Einbau von Eisen, welches nach dem 5. Tag erscheint, durch Fe 59, welches langsam aus den metabolisch aktiven Reserven übertritt, beeinflußt wird, ins Knochenmark eingebaut wird und anschließend zirkuliert ("reutilization"). Anschließend erfolgt die Wieder-

verwendung von Eisen, welches durch den Zerfall der roten Blutkörperchen im Knochenmark frei wird ("unwirksame Erythropoese"). In diesen Fällen kann die prozentuale Aufnahme markierten Eisens nicht zur Schätzung des Anteils des für die sofortige Erythropoese zurückhalten markierten Eisens verwendet werden (STOHLMAN, 1961 b). Wenn die prozentuale Aufnahme des Eisens als Maß einer wirksamen Erythropoese angesehen werden kann, empfiehlt es sich daher, die Berechnung des auftretenden Eisens am oder vor dem 5. Tag durchzuführen. Für quantitative Untersuchungen ist es wünschenswert, den Rückfluß von Fe 59 aus den Gewebsreserven durch Injektion von inaktiven Eisen (z.B. Imferon) zu unterdrücken (LAMERTON et al., 1959; LAJTHA, 1961). LAMERTON et al. (1959) fanden, daß, wenn das radioaktive Eisen bei Ratten mit und ohne Imferon gemessen wurde, die Kurve des auftretenden Eisens bei Tieren mit Imferon niedriger liegt, was auf eine niedrigere Endaufnahme bei diesen Tieren zurückzuführen ist. Darüberhinaus zeigten die Tiere mit Imferon, wenn die Aufnahme des Eisens nach Bestrahlung der Ratten (200r) gemessen wurde, eine signifikant geringere Endaufnahme als die Tiere ohne Imferon. Die dabei auftretenden Kurven unterschieden sich nicht nur in ihrer Form sondern auch in ihrer Größe. Die supressive Wirkung des injizierten, nicht radioaktiven Eisens wurde von LOCHNER (1966) bestätigt. Wegen ihrer schnellen und bequemen Anwendung erlangt die prozentuale Eisenaufnahme unter den verschiedenen Parametern, um die Erythropoese zu untersuchen, besondere Bedeutung bei der Untersuchung von einer größeren Anzahl kleiner Versuchstiere. Jedoch sollte dieser Parameter am Menschen nur mit Vorsicht verwandt werden und so weit wie möglich andere Parameter zur Messung der Erythropoese angewandt werden, die sich nicht auf die Verabreichung von radioaktivem Eisen stützen (STOHLMAN, 1961 b).

Klinische Anwendungsmöglichkeiten

Die Aufnahme von Fe 59 bei der Untersuchung der Erythropoese hat bestimmte, wenn auch begrenzte, klinische Anwendungsmöglichkeiten. Die Auswertung der Kurve ist bei hämatologischen Erkrankungen anstelle einzelner Ergebnisse besonders zu bevorzugen. Untersuchungen mit radioaktivem Eisen sind besonders empfehlenswert bei:

- a. Untersuchungen der medullären und extramedullären Erythropoese durch in vivo Messungen: Die Messung der Fe 59 Radioaktivität an der Körperoberfläche gibt Hinweise auf die Eisenbewegung im Organismus und erlaubt, den Gehalt des injizierten radioaktiven Eisens zu messen, welches zur Neubildung von Erythrozyten ins Knochenmark übertritt, im Vergleich zu dem, welches in Leber, Herz und Milz gelangt (HUFF et al., 1950; LAJTHA und SUT, 1955; STOHLMAN, 1961 b; PRIBILLA, 1964). Messungen wurden mit einem Plankkristall durchgeführt und der erste über einem Organ gemessene Wert gleich 100 gesetzt und alle weiteren Werte darauf bezogen (SZUR und SMITH, 1961). Mit dieser Methode ist es gelungen, die Splenomegalie begleitet von extramedullären Erythropoese von der Splenomegalie mit aktiver Zerstörung von Erythrozyten oder der Entfernung von imperfekten Zellen zu trennen (ELMLINGER et al., 1953).
- b. Bei Anämie, welche durch eine erythrozytäre Hyperplasie und eine Retikulozytopenie charakterisiert ist. Untersucht man in Fällen von Blutverlust oder Hämolyse die Erythropoese entweder mit Hilfe der benötigten Transfusion oder durch den Gehalt an peripheren Retikulozyten, beide Methoden sind bezüglich ihrer Aussage nicht brauchbar, so daß jetzt die Methode der Fe 59-Aufnahme besonders wertvoll ist (STOHLMAN, 1961 b). Bei Eisenmangelanämie und Polycythæmia vera ist die Fe 59 Inkorporation fast vollgezogen, dagegen ist sie bei hämolytischer Anämie und bei hypoplastischer Anämie sehr niedrig.

Bei Anämie mit aplastischer Knochenmarkserkrankung ist die Eiseninkorporationsmethode nicht anwendbar (STOHLMAN, 1961 b).

TEIL IV

BESTIMMUNG DER LEBENSZEITEN VON ERYTHROZYTEN MIT HILFE VON Fe 59

Um die Neubildung und den Zerfall von Erythrozyten vollständig verstehen zu können, kann die Bestimmung der Lebensdauer der Erythrozyten eine wichtige Information darstellen. Bei der Untersuchung der Lebensdauer von Erythrozyten mit Hilfe von Fe 59 erhält man eine Kurve, welche auf ausgedehnten Messungen des inkorporierten radioaktiven Eisens in roten Blutzellen basiert (BURWELL et al., 1953; HUFF und JUDD, 1956; BERLIN, 1964; CARTER, 1964).

Experimente und Ergebnisse

1. "Cohort" Markierungsmethode (im Blut d. Menschen)

Innerhalb der ersten Woche nach i.v. Verabreichung von Fe 59, wenn der größte Teil des Eisens das Knochenmark verläßt, ist es fast vollständig in den Erythrozyten inkorporiert. Zwischen dem 7. und 10. Tag nach Verabreichung erreicht die Kurve (welche jetzt als Kurve der Lebensdauer der Erythrozyten interpretiert wird), ein Plateau und bleibt beinahe 100 Tage konstant. Da Erythrozyten absterben, fällt der Gehalt an mit Eisen markierten Erythrozyten langsam ab (HUFF und JUDD, 1956). Theoretisch würde man ein kontinuierliches Absinken dieser Kurve bis zum Nullwert der Inkorporation erreichen. Wegen der Wiederverwendung des Eisens jedoch sinkt diese Kurve nicht ständig, sondern steigt auf den ursprünglichen Wert bis zum 140. Tag an. Aus dieser Kurve kann die mittlere Lebensdauer errechnet werden (POLLYCOVE, 1967).

$$L \text{ (mittlere Lebensdauer)} = T - \text{mittlere Markierungszeit,}$$

wobei T die Zeit ist von T_0 bis zu dem Zeitpunkt, zu dem die Wiederverwendung beginnt.

2. "Random" Markierungsmethode (BERLIN, 1964; BERGNER, 1965)

Blut wird dem Patienten entnommen und nach Inkubation mit Fe 59, Cr 51 oder DFB 32 in die Patienten zurückinfundiert. Die Abnahme der Radioaktivität/ml RBZ im Blut wird dann verfolgt. Bei dieser Methode wird angenommen, daß im Blut eine "random population" mit der Vertretung von jungen bis zu alten Erythrozyten vorhanden ist. Bei dieser Methode sind 20-30 Tage nötig, um die Lebensdauer zu bestimmen.

3. Über eine schnell ausführbare, auch für die Klinik geeignete Methode wurde von DAGG et al., (1972) berichtet. Nach einer "cohort" Markierung der Erythrozyten wird die Lebensdauer nach dem "occupancy" Prinzip (ORR und GILLESPIE, 1968; PERL und CHINARD, 1969) bestimmt. Zuerst wird die "occupancy" in den Erythrozyten, O_2 (d.h., radioaktives Eisen in 100 ml RBZ), errechnet. Es gilt:

$$O_2 = \frac{O_1 \times C_2}{C_1}$$

wobei C_1 = "Capacity"₁ = stabiles Eisen in 100 ml Plasma,
 C_2 = "Capacity"₂ = stabiles Eisen in 100 ml RBZ,
 O_1 = "Occupancy"₁ = radioaktives Eisen in 100 ml Plasma.

Aus O_2 und dem höchsten Wert der Fe 59 Inkorporationskurve wird die mittlere Lebenszeit folgendermaßen errechnet:

$$\text{mittlere Lebensdauer der RBZ} = \frac{O_1 \times C_2}{C_1 \times \text{Fe 59 Inkorporation}}$$

Mit allen diesen Methoden wurde beim Menschen die mittlere Lebensdauer der Erythrozyten von 110 - 120 Tagen bestimmt.

Diskussion

Die Erythrozyten sterben nicht nur während der begrenzten Lebensdauer dieser Zellen, sondern auch wegen der zufälligen Zerstörung durch "Unfälle" (LAJTHA, 1961). Die letztere Form der Zerstörung ist besonders deutlich bei bestimmten Erkrankungen, besonders bei haemolytischen Erkrankungen. Wenn die Zerstörung von roten Blutkörperchen ausschließlich auf ihr Alter zurückzuführen ist, zeigt die Kurve der Lebensdauer ein lineares Absinken in der Aufnahme von Fe 59. Wenn eine zufällige Zerstörung eintritt, kann ein exponentielles Absinken beobachtet werden (LAJTHA, 1961). Die oben dargestellte sogenannte "cohort" Markierungs-Methode, die die Lebensdauer mit Hilfe von Fe 59 bestimmt, gibt einen absoluten Index der Lebensdauer von Erythrozyten, d.h. sie markiert eine bestimmte Population junger Zellen, welche hauptsächlich aus neugebildeten retikulozyten zu dem Zeitpunkt besteht, zu dem das Eisen zirkuliert. Der Nachteil dieses sehr direkten Indikators zur Bestimmung der Lebensdauer von roten Blutkörperchen ist die Zeit, die aufgewendet werden muß; Da die durchschnittlich alten Zellen nicht mitmarkiert werden, kann die Lebensdauer so lange nicht erfasst werden, bis die Zellen einen Lebenszyklus durchlaufen haben (LAJTHA, 1961). Deshalb wird diese Methode hauptsächlich bei Versuchstieren angewendet. Nach BERLIN (1964) ist die genaue Bestimmung der Lebensdauer aus der Erythrozyten-Überlebungskurve allein fast unmöglich. SILVER (1962) empfiehlt neben dem Höchstwert der Fe 59 Inkorporation auch die PETR in Betracht zu nehmen. Schwierigkeiten in der Interpretation der Kurve der Lebensdauer treten wegen der Wiederverwendung auf. Diese können jedoch vermindert werden durch die Verabreichung einer großen Dosis nicht radioaktiven Eisens während der Messung, um Fe 59 zu verdünnen, welches zur Wiederverwendung abgestorbener roter Blutkörperchen übertritt (FINCH et al., 1949). Bei der Verwendung des "occupancy" Prinzips müssen alle Bestimmungen vor der Wiederverwendung erhalten werden.

Außerdem ist eine genaue Bestimmung der Lebensdauer der Erythrozyten nur dann möglich, wenn ein Fließgleichgewicht (steady state) vorhanden ist, d.h. wenn die Zahl der abgebauten Erythrozyten der der neugebildeten entspricht. Bei einem "non steady state" werden die Ergebnisse durch die deformierte Altersdistribution und teilweise durch das wechselnde Erythrozytenvolumen verfälscht (DAGG et al., 1972).

Bedeutung der Lebensdauer in erythropoetischen Kalkulationen

Mit Hilfe der Lebensdauer von Erythrozyten können die folgenden zwei wichtigen Parameter bestimmt werden zit. GORDON (unveröffentlicht).

- 1) Anzahl der ersetzten Erythrozyten pro Tag = Gesamterythrozytenzahl des Körpers
Lebensdauer RBZ (Tage)
= $2,4 \times 10^{11}$ RBZ/Tag
- 2) Markumsatzzeit der einzelnen Speicher = Relative Größe des Speichers
Tägliche Ersatzzahl der RBZ
("turnover time") (TT)

OSSGOOD (1954) and DONAHAY (1958) hatten die relative Größe des Erythroblastenspeichers von $6,0 \times 10^{11}$ bzw. $3,4 \times 10^{11}$ Erythroblasten bestimmt und dementsprechend die TT von 2,5 bzw. 1,4 Tagen errechnet.

TEIL V

STUDIUM DER ERYTHROKINETIK MIT Fe 59-AUTORADIOGRAPHIE

Radioaktives Fe 59 sendet schwache γ Strahlen neben β Strahlen aus. Aus diesem Grund wird es in autoradiographischen Studien der Erythropoese angewendet (SUIT, 1957; ALPEN und CRANMORE, 1959; LAJTHA, 1961; ERSLEV, 1962). Obwohl dem Fe 59 zwei der wichtigsten Voraussetzungen eines idealen Isotops für diesen Zweck, nämlich hohe Löslichkeit und lange Halbwertszeit (LAJTHA, 1959) fehlen, wird es für Studien der Kinetik der erythropoetischen Reihe als ausgezeichnet geeignet angesehen (ALPEN u. CRANMORE, 1959). Es markiert alle Erythrozytenvorläufer in dem Maße, wie es der Position der Zellen in der Entwicklungsreihe entspricht. Außerdem ist bei diesen Studien die Tatsache, daß Fe 59 nicht austauschbar ist, von höchster Wichtigkeit. Im Vergleich zu radioaktivem Thymidin (H^3 -TDR), welches durchschnittlich nur 50 bis 70 Kerne pro Knochenmarkzelle erlaubt, sind bei Fe 59 einige hundert Kerne ohne intrazellulärem Strahlenschaden möglich. Schließlich wird Fe 59 ein Bestandteil der ausgereiften Erythrozyten und ermöglicht damit das Studium der Entwicklung und des Lebens der Erythrozyten vom Vorläufer bis zur kernlosen Form.

Experimente und Ergebnisse

Mit der Fe 59 Autoradiographie wurden die folgenden Daten ermittelt:

- a. Die Generationszeit der Erythroblasten wurde beim gesunden Hund (mongrel dog) auf 17-20 Std., beim entbluteten Tier auf 17-18 Std. (ALPEN und CRANMORE, 1959) und beim gesunden Menschen auf 20-24 Std. bestimmt (LAJTHA, 1957).
- b. Der mitotische Index (MI) beträgt nach ALPEN und CRANMORE (1959) für den Pronormoblast, $MI = 3,9\%$, für den Normoblast, $MI = 2,6\%$.

- c. Die "Generationszeit" (T_g) der Pronormoblasten und Normoblasten wurde aus dem MI (ALPEN und CRANMORE, 1959) von GORDON (unveröffentlicht) bestimmt.

$$\text{Da } MI = \frac{N_m}{N} = \frac{T_m}{T_g} \quad \text{wobei } N = \text{die Gesamtzahl der Zellen im Knochenmarkausstrich}$$

$$N_m = \text{Die Zahl der radioaktiv markierten Mitosen im Knochenmarkausstrich}$$

$$T_m = \text{Mitosezeit}$$

$$T_g = \text{Generationszeit, d.h. die Zeit von dem Ende einer Mitose bis zum Ende der darauffolgenden Mitose}$$

Wenn wir annehmen, daß $T_m = 1$ Stunde betrifft, dann wird die Generationszeit für Pronormoblasten wie folgt errechnet:

$$\frac{3,9}{100} = \frac{1 \text{ Std.}}{T_g}$$

$$T_g = 25,6 \text{ Std.}$$

Ähnlich wird die Generationszeit für Normoblasten wie folgt errechnet:

$$\frac{2,6}{100} = \frac{1 \text{ Std.}}{T_g}$$

$$T_g = 38,2 \text{ Std.}$$

In einem späteren Versuch hatten ALPEN et al. (1962), um die Wiederverwendung des Fe 59 zu vermeiden, ein Eisen-Polysaccharid-Präparat (Astrafer) in einer Menge von 5 ml/ Hund täglich injiziert. Auch wurde die spezifische Aktivität des Fe 59 von 0,2 c/gm auf 2,4 - 4 c/gm erhöht. Die Generationszeit war für Pronormoblasten im Vergleich zu früheren Befunden (ALPEN und CRANMORE, 1959) niedriger. Wieder konnte kein Unterschied zwischen entbluteten und Kontroll-Tieren festgestellt werden.

d. Durchschnittsaufenthalt der Retikulozyten im Knochenmark
(ALPEN u. CRANMORE, 1959)

Bei Hunden, die unter physiologischen Verhältnissen gehalten wurden, war diese Zeit für Knochenmarkretikulozyten 22 Stunden, für Blutretikulozyten 24 Stunden. Die Blutentnahme hatte keinen Einfluß auf die Aufenthaltszeit.

- e. Auf Grund der abnehmenden Kernzahl ist es möglich, die durchschnittliche Anzahl von Teilungen von Erythroblasten bis zu Erythrozyten festzustellen. Die fraktionelle Verdünnung der Kernzahl (F) = $\frac{1}{2^n}$, wobei n die Anzahl der Teilungen ist.

Wenn die Zelle sich einmal teilt, ist $F = \frac{1}{2^1} = \frac{1}{2}$ = die Hälfte der durchschnittlichen Kernzahl.

Wenn wir annehmen, daß F bekannt ist, können wir n wie folgt errechnen:

$$\text{Wenn } F = 1/2 = \frac{1}{2^n} = \frac{1}{e^{0,693 n}}, \text{ wobei } 0,693 \text{ der}$$

Grad oder die Verschwindungskonstante ist; dann,

$$2 = e^{0,693 n}$$

$$\log 2 = 0,693 n$$

$$n = \frac{\log 2}{0,693} = \frac{0,693}{0,693} = 1$$

$n = 1$, also 1 Teilung.

In ihrem Versuch fanden ALPEN und CRANMORE (1959)

$$F = \frac{1}{5} = \frac{1}{2^n} = \frac{1}{e^{0,693 n}}$$

$$5 = e^{0,693 n}$$

$$\log 5 = 0,693 n$$

$$n = \frac{\log 5}{0,693} = \frac{1,609}{0,693} = 2,3$$

Das bedeutet eine durchschnittliche 2,3 Teilung, d.h. 50% der Zellen teilen sich 2mal; 50% teilen sich 3mal.

Diskussion

Die Versuche von ALPEN und CRANMORE (1959) und ALPEN et al. (1962) zeigten, daß vermehrte Erythropoese keinen Einfluß auf die Generationszeit der Erythroblasten und Pronormoblasten oder auf den Durchschnittsaufenthalt der Retikulozyten im stimulierten Knochenmark hatte. Sie stellten allerdings fest, daß während im Knochenmark der Kontrollgruppe nach 24 Std. 100% der Erythroblasten markiert blieben, der Anteil der markierten Erythroblasten in den entbluteten Tieren nach gleicher Zeit nur 10% war, d.h. es gab ein Einströmen einer großen Anzahl von unmarkierten Zellen zum Pro-Erythroblast-Speicher. Dies wurde so erklärt, daß die vermehrte Erythropoese bei entbluteten Tieren die Folge einer rapiden Beschleunigung der Differenzierungsrate multipotenter Stammzellen und der darauf folgenden Erweiterung der kernhaltigen Erythrozyten war (ALPEN et al., 1962).

STOHLMAN (1961a) und BRECHER and STOHLMAN (1962) hatten in einem Versuch mit polyzythämischen Ratten, denen Erythropoetin von 10 C.S. fünf mal alle 12 Stunden verabreicht wurde, festgestellt, daß Erythropoetin die Transitzeit der kernhaltigen Erythrozyten im stimulierten Mark verkürzte und Makroretikulozyten mit kurzer Lebensdauer entstanden. In diesem Zusammenhang wurde das Prinzip der "terminal division" von BRECHER und STOHLMAN (1962) vorgeschlagen. Demnach ist die Anzahl der Teilungen von bestimmten Normoblasten zwischen Differenzierung und dem Auftritt der Makroretikulozyten vermindert. ALPEN und CRANMORE (1959) sahen im peripheren Blut gesunder Hunde kleine Gruppen von Erythrozyten mit großer Kernzahl, die sich wahrscheinlich auf einer Art "skipped division" basiert, bei der der Pronormoblast sich einmal teilt und der basophile Normoblast ohne weitere Teilung reift.

Entgegen dieser Auffassung einer "fixierten" Generationszeit von ALPEN und einer Verringerung der Zahl der Mitosen durch "terminal division" von STOHLMAN behaupten, wie berichtet GANZONI (1970)

HANNA et al., (1969) und LORD (1967) auf Grund ihrer autoradiographischen Studien mit radioaktivem Thymidin, daß bei vermehrter Erythropoese die Generationszeit abnehmen bzw. die Zahl der Mitosen und die Teilungen durch bestimmte Erythroblasten vermehrt werden kann.

DISKUSSION der Teile I-V

Die Bedeutung von Fe 59 bei der Untersuchung der Erythropoese beruht auf der Tatsache, daß physiologisches Eisen inkorporiert wird, um in Zellen Hämoglobin zu synthetisieren und daß es in den Zellen bleibt bis zu deren Zerstörung. Das Isotop stellt ein experimentelles und diagnostisches Hilfsmittel zur Schätzung der Produktion der roten Blutkörperchen dar, weil es möglich macht, verschiedene Parameter zu messen, die über die Erythropoese Aufschluß geben. Die bedeutendsten Parameter sind die Plasmaeisentransportrate und die Fe 59-Aufnahme.

Wenn Eisen in das Plasma entweder vom Darmkanal oder von anderen Eisen-Pools des Körpers resorbiert wird, wird es an Transferrin gebunden und $2/3 - 3/4$ von diesem Eisen wird vom Knochenmark aufgenommen, um rote Blutkörperchen zu bilden. In 4-6 Stunden gelangt Eisen in einer linearen Kurve vom Plasma zum Knochenmark. Der Wert der Eisenaufnahme vom Knochenmark kann durch die PETR gemessen werden und kann als gute Darstellungsmöglichkeit der gesamten Erythropoese dienen. Der Grad der Hämoglobinsynthese und das Auftreten der roten Blutkörperchen im zirkulierenden Blut können durch die Inkorporation von radioaktivem Eisen in den peripheren roten Blutkörperchen gemessen werden. Dieser Prozentsatz der Eisenaufnahme dürfte als ein Maß der eigentlichen Erythropoese angesehen werden.

Obwohl die PETR verschiedene Fehlermöglichkeiten einschließt - auf Grund verschiedener Variabilitäten, die man in Kauf nehmen muß - bleibt die Tatsache, daß sie den Grad der Erythropoese wesentlich genauer als die Eisenaufnahme ausdrückt. Diese beruht darauf, daß die PETR direkt den Grad der erythropoetischen Aktivität des Knochenmarks erfaßt. Trotz dieser großen Vorzüge ist die PETR durch besonders schwierige Techniken gekennzeichnet und weniger empfehlenswert als der Prozentsatz der Fe 59-Aufnahme. Die Fe 59-Aufnahme ist nur ein indirekter Indikator für die Erythropoese, da sie die Hämosynthese direkt mißt. (Darüberhinaus

scheinen die Fe 59-Aufnahme und die Hämoglobinsynthese nicht identische Prozesse zu sein, da die früheren hämoglobin-haltigen Zellformen Eisen anlagern können, das in späteren Zellformen nicht zur Synthese eingebaut wird (LAJTHA und SUIT, 1955). Jedoch kann es als Maß der Proliferation von Knochenmarkzellen interpretiert werden, wenn sich die "steady state" Produktion von roten Blutkörperchen und der Untergang die Waage halten. Aber es muß bedacht werden, daß dieser Parameter nur eine integrale Berechnung der erythropoetischen Aktivität beim Tier ermöglicht und es fehlt eine weitere Möglichkeit für die Analyse der extramedullären Erythropoese. Der Parameter enthält andere wichtige Begrenzungen:

Verabreichtes Fe 59 kann nicht nur von Knochenmarkzellen inkorporiert werden, sondern auch von Retikulozyten, die sich zur Zeit der Applikation im Kreislauf befinden. Deshalb dürfte die Eisenaufnahme sowohl diese Inkorporation als auch die im direkten Zusammenhang mit der Produktion der roten Blutkörperchen stehende Inkorporation widerspiegeln (GORDON und WEINTRAUB, 1962). Der mögliche Austritt von schon geformten Retikulozyten aus dem Knochenmark, welcher nicht auf Grund der erythropoetischen Aktivität erfolgt, dürfte ebenso die Überlegung beeinflussen, wie die Wiederverwendung von Eisen aus zerstörten roten Blutkörperchen (wie z.B. bei Verletzung des Knochenmarks). Der Parameter unterscheidet auch nicht zwischen endogener und exogener Erythropoese. Diese Beschränkungen werden besonders im Massenversuch durch die einfache Handhabung, die Eleganz und die Schnelligkeit der Methode, bei der Eisen 59 inkorporiert wird, kompensiert. Wenn eine frühe Zerstörung von Erythrozyten erwartet wird, kann Fe 59 eine wertvolle Information über die Lebensspanne der Zellen geben. Das Verschwinden des Isotops muß in Kauf genommen werden, aber in Fällen wo die Lebensspanne der Zellen abnorm kurz ist, wird der Zerfall als nicht bedeutsam angesehen.

Da Fe 59 Beta-Strahlen aussendet, kann es in radioautographischen Studien verwendet werden und es ist besonders gebräuchlich bei Studien über die Reifung und Proliferationsprozessen von Vorstufen der Erythrozyten.

Mäuse, bei denen durch Hypoxie eine Polyzythämie erzeugt wurde, haben sich als besonders ökonomisch aussagefähige Tiere erwiesen und waren für die Entdeckung des "Erythropoetic Stimulating Faktors" -(ESF) von Bedeutung. Mit diesen Mäusen ist der Nachweis einer so kleinen Menge wie 0,02 Einheiten ESF möglich. Die Fe 59%-Aufnahme, der Hämatokritwert und die Retikulozytenzahl sind die drei wichtigen Parameter in den in vivo-Versuchssystemen. In den in vitro-Versuchssystemen ist die Fe 59 Aufnahme-technik eingeführt worden, die aber noch nicht als perfekt angesehen werden kann. Immunbiologische und biochemische Versuchssysteme befinden sich noch in den Anfängen.

Der Wert der Parameter, der auf dem Gebrauch von radioaktiven Eisenisotopen basiert, wird bei hämatologischen Experimenten nicht bezweifelt. Keiner dieser Parameter kann allein für die Auswertung der Erythropoese herangezogen werden. Sie sollten in der Weise gebraucht werden, daß sie sich gegenseitig ergänzen und auch mit einer genauen Untersuchung der hämatopoetischen Organe, eingeschlossen der Knochenmarkmikroskopie (LOBUE et al., 1963) und dem Gebrauch anderer aussagekräftiger Parameter, wie Hämatokritbestimmung und der Retikulozytenzählung verbunden werden.

Da die Verwendung aller dieser Parameter in einem einzigen Experiment nicht immer möglich ist, muß man die am besten geeigneten Parameter für den jeweiligen Fall auswählen. Am besten allerdings liefern alle diese Parameter eine semi-quantitative oder indirektquantitative Erfassung der Erythropoese und des ESF. Die Reindarstellung und Kristallisation des ESF wird angestrebt und könnte direkt zu quantitativen und biochemischen Versuchssystemen führen. Schließlich sollte unterstrichen werden, daß die richtige Interpretation der Testergebnisse durch die Anwendung geeigneter biostatistischer Auswertungsmethoden gesichert wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Die derzeitigen Kenntnisse über die Erythropoese weisen darauf hin, daß die Bildung von roten Blutzellen durch ein Glukoprotein-Hormon, Erythropoetin, gesteuert wird. O_2 Mangel ist der entscheidende Faktor für die Anregung der Erythropoese. Das aktive Erythropoetin im Blut setzt sich zusammen aus Erythrogenin und eine Protein-Substanz. Es wurde nachgewiesen, daß die Niere direkt oder indirekt und unter Umständen auch die Leber, an der Produktion des Erythrogenins beteiligt sind.

Die Hauptwirkung des Erythropoetins besteht in der Stimulierung von erythropoetinsensitiven Stammzellen, um sich in der erythroiden Reihe zu entwickeln. Diese Entwicklung ist insbesondere gekennzeichnet durch die Synthese von RNS verschiedener Art, welche zu einer Veränderung der Morphologie und einer Vermehrung der Eisenaufnahme führt. Diese Wirkung kann durch in vivo- und in vitro-Versuchsanordnungen nachgewiesen bzw. durch anti-erythrogenin Serum aufgehoben werden. Neben der zur Zeit zur Verfügung stehenden in vivo-Versuchsanordnungen zu Studien der Erythropoese wurden auch brauchbare in vitro-Systeme entwickelt.

Mit Hilfe des radioaktiven Fe 59 war es möglich, folgende physiologische Prozesse, die für die Erythropoese von Bedeutung sind, darzustellen:

1. Die Resorption von Fe 59 aus dem Darm und Faktoren, die die Resorption des Eisens beeinflussen.
2. Der Transport des Fe 59 im Plasma.
3. Den Transport des Fe 59 in die Vorstufen der Erythrozyten.

Zum direkten Studium der Erythropoese hat sich die Fe 59 Tracer-Technik auch als sehr geeignet erwiesen. Die folgenden Methoden und Parameter wurden zum Studium der Erythropoese diskutiert:

1. Plasmaeisen "Clearance" Rate.
2. Die Messung der Gesamterythropoese (Parameter: die Plasmaeisen-Transport-Rate).
3. Die Messung der wirksamen Erythropoese (Parameter: die Inkorporation des Fe 59 in die peripheren Erythrozyten).
4. Die Bestimmung der Lebenszeiten der Erythrozyten.
5. Studium der Erythrokinetik mit Fe 59 Autoradiographie.

SUMMARY

According to our current knowledge, erythropoietin, a glycoprotein hormone, regulates the production of red blood cells. A lack of O_2 is a decisive stimulus for erythropoiesis. The active erythropoietin present in the blood consists of erythrogein and a protein substance. It has been proven that the kidneys participate directly or indirectly in the production of erythrogein; and that under certain circumstances the liver also participates in erythrogein production.

The main effect of erythropoietin is the stimulation of the development of the erythropoietin sensitive stem cells into the erythroid series. This development is characterized by the synthesis of several kinds of RNA; this results in morphological changes and an increased iron uptake. This effect can be demonstrated in in vivo and in vitro experiments, and can be neutralized by anti-erythrogein serum.

In addition to the in vivo assay systems there are also useful in vitro systems on hand for the study of erythropoiesis.

The following physiological processes, important to the understanding of erythropoiesis, can be studied with radioactive Fe 59:

1. The resorption of Fe 59 from the intestine and factors influencing the resorption of iron.
2. Transport of Fe 59 in the plasma.
3. Transport of Fe 59 in red blood cell precursors.

The Fe 59 tracer technique proved to be also very important for the direct investigation of erythropoiesis. The following methods and parameters for the study of erythropoiesis were discussed:

1. Plasma Iron Clearance Rate.
2. The measure of total erythropoiesis (parameter: the Plasma Iron Transport Rate).
3. The measure of effective erythropoiesis (parameter: the incorporation of Fe 59 in the peripheral erythrocytes).
4. The determination of the life span of erythrocytes.
5. The study of erythrokinetics with autoradiography.

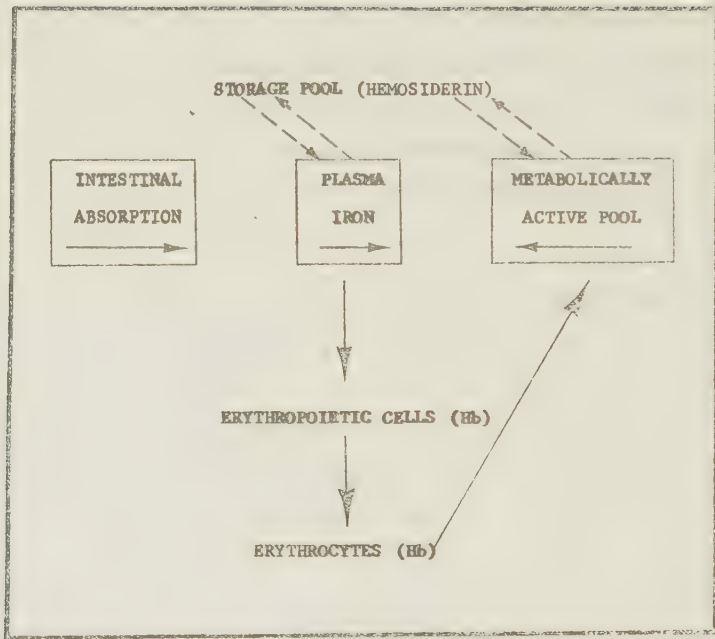


FIGURE 1: Scheme of pathways of iron metabolism (IAJTHA, 1961).

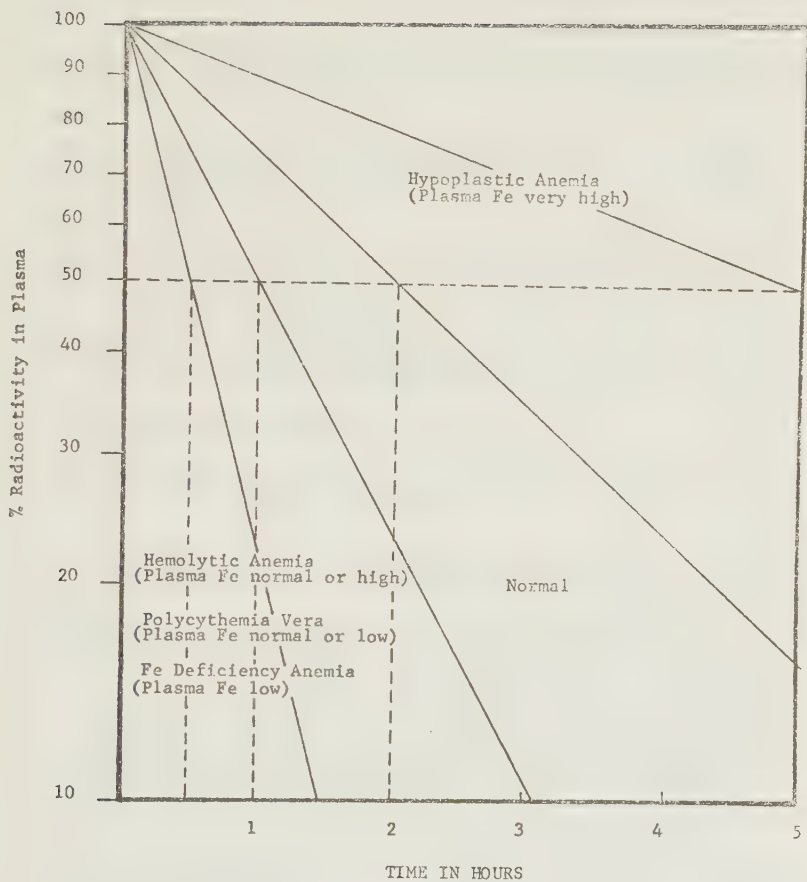


FIGURE 2: Plasma clearance of radioiron in normal and pathological conditions (LAJTHA, 1961)

LITERATURVERZEICHNIS

1. Alpen, E. L. The metabolic fate of erythropoietin. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: Erythropoiesis. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
2. Alpen, E. L. and D. Cranmore. Observations on the regulation of erythropoiesis and on cellular dynamics by Fe 59 autoradiography. In: F. Stohlman, Jr., Edit.: The Kinetics of Cellular Proliferation. Grune and Stratton, Inc., New York 1959.
3. Alpen, E. L., D. Cranmore and M. E. Johnston. Early observations on the effects of blood loss. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: Erythropoiesis. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
4. Ardaillou, R., Y. Najean, J. Altman and G. Richet. Etude de l'erythropoiese chez les rats nephrectomises et porteurs d'une autogreffe de rein. Rev. franc. Etud. clin. biol. 5 (1960), 189.
5. Baxter, C. F., E. H. Belcher, E. B. Harris and L. F. Lamerton. Anemia and erythropoiesis in the irradiated rat: an experimental study with particular reference to techniques involving radioactive iron. Brit. J. Haemat. 1 (1955), 86.
6. Bergner, P. E. Stochastic concepts in clinical red blood cell survival studies. Nature 205 (1965), 975.
7. Berlin, M. Bestimmung der Erythrozytenlebensdauer. JAMA 188 (1964), 375.
8. Bessis, M. Erythropoiesis as seen with the electron microscope. In: F. Stohlman, Jr., Edit.: The Kinetics of Cellular Proliferation. Grune and Stratton, Inc., New York 1959.
9. Bleiberg, I., M. Liron and M. Feldman. Reversion by erythropoietin of the suppression of erythroid clones caused by transfusion-induced polycythemia. Blood 28 (1966), 135.
10. Borsook, H. A. Graybiel, G. Keighley and E. Windsor. Polycythemic response in normal adult rats to a nonprotein plasma extract from anemic rabbits. Blood 9 (1954), 734.
11. Bothwell, T. H., S. Callender, B. Mallett, and L. J. Witts. Quantities of radioactive iron. Brit. J. Haemat. 2 (1956), 1.
12. Bothwell, T. H., A. V. Jemtado, D. M. Donohue and C. A. Finch. Erythropoiesis IV: The plasma iron turnover as a measure of erythropoiesis. Blood 12 (1957), 709.
13. Bothwell, T. H., G. Pirzio-Biroli, and C. A. Finch. Iron Absorption. J. Lab. Clin. Med. 51 (1958), 24.

14. Brecher, G. New methylene blue as reticulocyte stain. *Am. J. Clin. Path.* 19 (1949), 895.
15. Brecher, G. and F. Stohlman, Jr. Reticulocyte size and erythropoietic stimulation. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 107 (1961), 887.
16. Brecher, G. and F. Stohlman, Jr. The macrocytic response to erythropoietin stimulation. In: L. O. Jacobson and M. A. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
17. Brise, H. and Hallberg, L. Effect of ascorbic acid on iron absorption. *Acta Med. Scand. Suppl.* 376 (1962), 51.
18. Brown, E. B., Jr. The utilization of iron in erythropoiesis. *Amer. J. Clin. Nutrit.* 12 (1963), 77.
19. Bruschke, G. *Der Eisenstoffwechsel*. Theodor Steinkopf Verlag, Dresden and Leipzig 1964.
20. Burwell, L. E., B. A. Brickley, and C. A. Finch. Erythrocyte life span in small animals; comparison of two methods employing radio-iron. *Amer. J. Physiol.* 192 (1953), 718.
21. Callender, G. The intestinal mucosa and iron absorption. *Brit. Med. Bull.* 23 (1967), 263.
22. Carnot, P. and C. De Flandre. Sur l'activite hemopoietique du serum au cours de la regeneration du sang. *Comp. Rend. Acad. Sc.* 143 (1906), 384.
23. Carter, M., G. Matrone, W. Mendenhall. Estimation of the life span of red blood cells. *J. Gen. Physiol.* 47 (1964), 851.
24. Contrera, J. F. and A. S. Gordon. Erythropoietin; production by a particulate fraction of rat kidney. *Science* 152 (1966), 653.
25. Cooper, W. M. and W. Tittle. Polycythemia associated with a benign kidney lesion. *Ann. Intern. Med.* 77 (1957), 1008.
26. Cotes, M. P. and D. R. Bangham. Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at reduced pressure. *Nature* 191 (1961), 1065.
27. Dagg, J. H., P. W. Horton, J. S. Orr and J. Shimmins. A direct method of determining red blood cell life span using radioiron; an application of the occupancy principle. *Br. J. Haemat.* 22 (1972), 9.
28. De Gowin, R. L., D. Hofstra and C. W. Gurney. The mouse with hypoxia induced erythemia, an erythropoietin bio-assay animal. *J. Lab. Clin. Med.* 60 (1962), 846.
29. Deutsch, E., M. Fischer und H. Frischauf. Anaemien bei Nierenkrankheiten. *Wien Z. inn. Med.* 42 (1961), 286.

30. Donahan, D. M., B. W. Gabrio and C. A. Finch. Quantitative measurement of hematopoietic cells of the marrow. *J. Clin. Invest.* 34 (1958), 1564.
31. Donati, R. H. *In vivo* reticulocyte radioiron assimilation. *J. Nuclear Med.* 7 (1966), 928.
32. Dowdle, E. B., D. Schlachter and H. Schenker. Active transport of Fe 59 by everted segments of rat duodenum. *Am. J. Physiol.* 198 (1960), 609.
33. Dubach, R., C. V. Moore and V. Minnich. Studies in iron transportation and metabolism IV: utilization of intravenously injected radioactive iron for hemoglobin synthesis, and evaluation of radioactive iron method for studying iron absorption. *J. Lab. Clin. Med.* 31 (1946), 1201.
34. Egli, R. and H. M. Keller. Die erythropoetische Wirkung von 11-Dehydrocorticosteron. *Schweiz. med. Wschr.* 88 (1956), 1060.
35. Elmlinger, P. J., R. L. Huff, C. A. Tobias and J. H. Lawrence. Iron turnover abnormalities in patients having anemia; blood and *in vivo* tissue studies with Fe 59. *Acta Haemat.* 9 (1953), 73.
36. Ericksen, L. Evidence for cytoplasmic formation of hemoglobin. *Exp. Cell Res.* 13 (1957), 624.
37. Erslev, A. J. Observation on the nature of the erythropoietic serum factor. *J. Lab. Clin. Med.* 50 (1957), 543.
38. Erslev, A. J. Erythropoietin *in vitro*. In: L. O. Jacobson and M. A. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
39. Erslev, A. J. and L. A. Kazal. Inactivation of erythropoietin by tissue homogenates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 129 (1968), 845.
40. Eskuche, I. and J. Hodgson. Effect of gamma irradiation on response of fasted rats to erythropoietin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119 (1965), 1102.
41. Essers, U. and H. Mann. Die Erythropoetinaktivität des Blutes bei Anaemie mit hypoplast. und hyperpl. Knochenmark. *Blut* 22 (1971), 297.
42. Finch, C. A., D. H. Coleman, A. G. Motulsky, D. M. Donahue and R. H. Reiff. Erythrokinetics in pernicious anaemia. *Blood* 11 (1956), 807.
43. Finch, C. A., J. G. Gibson, W. C. Peacock and R. G. Fluhrty. Iron metabolism. Utilization of intravenous radioactive iron. *Blood* 4 (1949), 905.

44. Fischer, S. Studies on the site of the mechanism and site of the action of erythropoietin. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: Erythropoiesis. Grune and Stratton, New York and London 1962.
45. Fisher, J. W. and B. J. Birchwell. The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney. *Acta Haemat.* 16 (1969), 224.
46. Fisher, J. W., D. D. Porteous, K. Hiroshima and S. C. Tso. Effects of cobalt on activity of sheep erythropoietin in rat kidney homogenates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122 (1966), 1015.
47. Fletcher, J. and E. R. Huekus. Significance of the binding of iron by transferrin. *Nature* 215 (1967), 584.
48. Fletcher, J. and E. R. Huekus. Function of transferrin. *Nature* 218 (1968), 1211.
49. Fliedner, R. M., H. Messner and B. Kubanek. Neuere Erkenntnisse zum Physiologie und Pathophysiologie der Erythropoese. In: W. Stich und G. Ruhenstroth-Bauer, Edit.: Hämatologie und Bluttransfusion. Band 8. J. F. Lehmanns Verlag, München 1969.
50. Forsell, J. Nephrogenous polycythemia. *Acta med. scand.* 161 (1958), 169.
51. Francis, G. E., W. Mulligan and A. Vormall. Isotopic Tracers. University of London Press, London 1959.
52. Fried, W. The role of the liver in the production of erythropoietin. In: Abstracts of the XIV. International Congress of Haematology. Sao Paulo 1972.
53. Fried, W., L. Plzak, L. O. Jacobson and E. Goldwasser. Erythropoiesis II. Assay of erythropoietin in hypophysectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92 (1956), 203.
54. Fried, W., L. Plzak, L. O. Jacobson and E. Goldwasser. Factors controlling erythropoietin production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94 (1957), 237.
55. Gallagher, N. Diskussionsbemerkung. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: Erythropoiesis. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
56. Ganzoni, A. M. Kinetik und Regulation der Erythrozytenproduktion. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970.
57. Garcia, J. F. and J. C. Schooley. Immunological neutralization of various erythropoietins. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 112 (1963), 72.

58. Garcia, J. F. and D. C. Van Dyke. Dose-response relationship of human urinary erythropoietin. *J. Appl. Physiol.* 14 (1959), 233.
59. Goldwasser, E., W. Fried and L. O. Jacobson. Studies on erythropoiesis VII. The effect of nephrectomy on response to hypoxic anoxia. *J. Lab. Clin. Med.* 52 (1958), 738.
60. Goodman, J. R. and S. G. Hall. Accumulation of iron in mitochondria of erythroblasts. *Brit. J. Haemat.* 13 (1967), 335.
61. Gordon, A. S. Hemopoietin. *Physiol. Rev.* 39 (1959), 1.
62. Gordon, A. S. The current status of erythropoietin. *Br. J. Haemat.* 21 (1971), 611.
63. Gordon, A. S. Unveröffentlicht.
64. Gordon, A. S., J. Lobue, S. Dornfest and W. Cooper. Reticulocyte and leucocyte release from isolated perfused legs and femurs. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
65. Gordon, A. S., S. J. Piliero and M. Tannenbaum. Erythropoietic activity of blood and tissues of anemic rabbits. *Amer. J. Physiol.* 181 (1955), 585.
66. Gordon, A. S. and A. H. Weintraub. Assay of the erythropoietic stimulating factor (ESF). In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
67. Gordon, A. S., J. Winkert, B. S. Dornfest and C. D. Siegel. Studies on the actions and properties of the circulating erythropoietic stimulating factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77 (1959), 650.
68. Gordon, A. S. and E. D. Zanjani. Some aspects of erythropoietin physiology. In: A. S. Gordon, Edit.: *Regulation of Hematopoiesis*. Appleton-Century-Crofts, New York 1970.
69. Gordon, A. S., E. D. Zanjani and W. D. McLaurin. The Renal Erythropoietic Factor (REF or Erythro-genin). In: J. W. Fisher and E. J. Cafruny, Edit.: *Renal Pharmacology*. Appleton-Century-Crofts, New York 1971.
70. Granick, S. Iron metabolism and hemochromatosis. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 25 (1949), 403.
71. Grant, W. C. and W. S. Root. Fundamental stimulus for erythropoiesis. *Physiol. Rev.* 32 (1952), 449.
72. Greenberg, G. R. and M. M. Wintrobe. A labile iron pool. *J. Biol. Chem.* 165 (1946), 397.

73. Hahn, P. F., W. F. Bale, E. O. Lawrence and G. M. Whipple. Radio-active iron and its metabolism in anemia. *J. Exp. Med.* 69 (1939), 739.
74. Hahn, P. F., J. F. Ross, W. F. Bale, W. M. Balfour and G. M. Whipple. Red cell and plasma volumes circulating and total as determined by radioiron and dye. *J. Exp. Med.* 75 (1942), 221.
75. Hanna, I. R., R. G. Tarbutt, L. F. Lamerton. Shortening of the cell cycle time of erythroid pre-cursors in response to anemia. *Brit. J. Haemat.* 16 (1969), 38.
76. Hansen, P. Studies on the determination of erythropoiesis using Fe 59 incorporation in starved rats. *Scand. J. Lab. Clin. Med.* 15 (1963), 357.
77. Hevesy, G. *Radioactive Indicators*. Inter-Science, New York 1948.
78. Hodgson, G. Synthesis of RNA and DNA at various intervals after erythropoietin injection in transfused mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (1967), 1045.
79. Hodgson, G. and I. Eskuche. Time course of effects of erythropoietin stimulating factor(s) (ESF) of Fe 59 distribution. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
80. Hodgson, G., M. Perretta, D. Yudilevich and I. Eskuche. Assay of "hemopoietin" in starved animals; properties of urinary hemopoietin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99 (1958), 137.
81. Hoeglund, S., K. Dehshiri and P. Reizenstein. A method of measuring plasma clearance of iron without blood samples and of estimating the extra-vascular uptake of radiovitamin B₁₂. *Phys. Med. Bio.* 12 (1967), 469.
82. Hosain, F. and C. A. Finch. Ferrokinetics: a study of transport iron in plasma. *J. Lab. Clin. Med.* 64 (1964), 905.
83. Huff, R. L. Ferrokinetics in normal persons and in patients having various erythropoietic diseases. *J. Clin. Invest.* 30 (1951), 1512.
84. Huff, R. L., T. J. Henessy, R. E. Austin, G. F. Garcia and B. M. Roberts. Plasma and red blood cell iron turnover in normal subjects and in patients having various haematopoietic diseases. *J. Clin. Invest.* 29 (1950), 1041.
85. Huff, R. L. and O. J. Judd. *Kinetics of Iron Metabolism: Advances in Biological and Medical Physics*. Vol. 4. Academic Press, New York 1956.

86. Huff, R. L., C. A. Robias and J. H. Lawrence. A test for red blood cell production. *Acta Haemat.* 7 (1952), 129.
87. Jacobson, L. O., E. Goldwasser, W. Fried and L. Plizak. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 179 (1957), 633.
88. Jandl, J. H. and J. H. Katz. The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42 (1963), 314.
89. Keighley, G. Experiences with assays, units and standards of erythropoietin. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
90. Koepke, J. K. and W. B. Stuart. The role of gastric secretion in iron absorption. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115 (1964), 927.
91. Korst, D. R. and F. H. Bethell. Erythrocyte radioiron uptake in the rat and the effects of cobalt. *J. Lab. Clin. Med.* 52 (1958), 356.
92. Korst, D. R., R. C. Bishop and F. H. Bethell. Assay of the erythropoietic factor using radioiron uptake in nitrogen mustard treated rat. *J. Lab. Clin. Med.* 52 (1968), 364.
93. Korst, D. R., P. E. Trenkel and J. E. Wilhelm. Studies utilizing short term marrow culture I. Ferrokinesics and erythropoietin. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
94. Krantz, S. E. Goldwasser and L. O. Jacobson. Studies on erythropoiesis XIV. The relationship of humoral stimulation to iron absorption. *Blood* 14 (1959), 654.
95. Kriss, J. P., E. O. Field and J. E. Gibbs. Effect of anaemia and transfusion polycythemia on phosphorus and iron uptake in erythrocyte pre-cursors in rat bone marrow, studied by means of triple tracer technique with ³²P, ⁵⁹Fe and ⁵¹Cr. *Brit. J. Haemat.* 5 (1959), 92.
96. Kubanek, B., Wl Tyler, L. Ferrari, D. Howard and F. Stohlman, Jr. Die Wirkung von Erythropoietin auf die haemopoetische Stammzelle. In: W. Stich und G. Ruhenstroth-Bauer, Edit.: *Hämatologie und Bluttransfusion*, Band 8. J. F. Lehmanns Verlag, München 1969.
97. Kuratowska, Z. The renal mechanism of the formation and inactivation of erythropoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 149 (1968), 128.
98. Lajtha, L. G. Bone marrow cell metabolism. *Physiol. Rev.* 37 (1957), 50.
99. Lajtha, L. G. The Use of Isotopes in Haematology. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1961.

100. Lajtha, L. G. Conference summary. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: Erythropoiesis. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
101. Lajtha, L. G., F. Stohlman, Jr., D. Nathan and A. L. Alpen. Discussion. In: F. Stohlman, Jr., Edit.: The Kinetics of Cellular Proliferation. Grune and Stratton, Inc., New York 1959.
102. Lajtha, L. G. and H. D. Suit. Uptake of radioiron (Fe 59) by nucleated red cells. Brit. J. Haemat. 1 (1955), 55.
103. Lamerton, L. F., E. H. Belcher and E. B. Harris. Blood uptake of Fe 59 in studies of red blood cell production. In: F. Stohlman, Jr., Edit.: The Kinetics of Cellular Proliferation. Grune and Stratton, Inc., New York 1959.
104. Lawrence, G. H., P. J. Elming and G. Fulton. Oxygen and the control of red blood cell production in primary and secondary polycythemia. Effects on the iron turnover patterns with Fe 59 as tracer. Cardiologia 21 (1952), 337.
105. Lange, R. D., T. A. Jordon, A. T. Ichiki and A. I. Chernoff. The haemagglutination-inhibition assay for erythropoietin: recent advances. In: Abstracts of XIV International Congress of Hematology. Sao Paulo 1972.
106. Lange, R. D., T. P. McDonald and T. A. Jordan. Antisera to erythropoietin: partial characterization of two different antibodies. J. Lab. Clin. Med. 73 (1969), 78.
107. Linman, J. W., F. H. Bethel and M. J. Long. The erythropoietic activity of batyl alcohol. J. Lab. Clin. Med. 52 (1958), 596.
108. Lobue, J., B. S. Dornfest, A. S. Gordon, J. Hurst and H. Quaestler. Marrow distribution in rat femurs determined by cell enumeration and Fe 59 labelling. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112 (1963), 1058.
109. Lobue, J. and A. S. Gordon. Conclusion. Seminars in Haematology 4 (1967), No. 4, 453.
110. Lochner, D. Quantitation of erythropoiesis by a new method I: studies on healthy subjects. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18 (1966), 493.
111. Loeb, V., C. V. Moore and R. Dubach. The physiologic evaluation and management of chronic bone marrow failure. J. Med. 15 (1955), 499.
112. Loeffler, R., D. A. Rapport and V. P. Collins. Radioiron citrate as tracer to determine disappearance rate of plasma iron in normal subjects. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88 (1955), 441.

113. Lord, B. I. Erythropoietic cell proliferation during recovery from acute hemorrhage. *Brit. J. Haemat.* 13 (1967), 160.
114. McDonald, T. P., E. D. Zanjani, T. Jordan, R. D. Lange and A. S. Gordon. Studies on the renal erythropoietic factor using a haemagglutination inhibition system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132 (1969), 533.
115. Matoth, Y. *In vitro* methods in the study of erythropoiesis. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
116. Mendel, G. A. Erythropoietin and iron absorption. *Blood* 18 (1961), 727.
117. Mirand, E. A. and T. C. Prentice. A simple test for erythropoietin in deproteinized plasma extract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93 (1956), 473.
118. Monti, A., M. F. Glynn and R. J. Dern. Studies with doubly labelled iron III. An evaluation of ferrokinetic data obtained with various chemical forms of tracer iron. *J. Lab. Clin. Med.* 61 (1963), 272.
119. Moore, C. V. The importance of nutritional factors in the pathogenesis of iron deficiency anemia. *Scand. J. Lab. Invest.* 9 (1957), 292.
120. Morgan, E. H. The interaction between rabbit, human and rat transferrin and reticulocytes. *Brit. J. Haemat.* 10 (1964), 442.
121. Nays, W. D., T. H. Bothwell and C. A. Finch. The role of the reticulo-endothelial cell in iron metabolism. *Brit. J. Haemat.* 6 (1960), 43.
122. Orr, J. S. and F. Gillespie. Occupancy principle for radioactive tracers in steady-state biological systems. *Science* 162 (1968), 138.
123. Osgood, E. E. Number and distribution of human hemic cells. *Blood* 9 (1954), 1141.
124. Paoletti, C. and M. Durand. Absence de consommation de la sidérophiline au cours de la synthèse de l'hémoglobine *in vitro*. *Rev. franç. Étud. clin. Biol.* 3 (1958), 259.
125. Paterson, J. C. S., D. Marrack and H. S. Wiggins. Hypoferraemia in the human subject: the importance of diurnal hypoferraemia. *Clin. Sci.* 11 (1952), 417.
126. Perl, W. and F. P. Chinard. Occupancy principle: nonidentity with mean transit time. *Science* 166 (1969), 260.

127. Piliero, S. J., P. T. Medici and A. S. Gordon. Unpublished observations. *Zit. A. S. Gordon. Hemopoietine. Physiol. Rev.* 39 (1959), 1.
128. Pirzio-Biroli, G. and C. A. Finch. Iron absorption III. The influence of iron stores on iron absorption in the normal subject. *J. Lab. Clin. Med.* 55 (1960), 216.
129. Plzak, L. F., W. Fried, L. O. Jacobson and W. Bethard. Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe 59. *J. Lab. Clin. Med.* 46 (1955), 671.
130. Pollicard, A. and M. Bessis. Sur un mode d'incorporation des macromolécules par la cellule visible au microscope électronique --- la rophocyotose. *CR* 246 (1958), 3194.
131. Pollycove, M. Iron metabolism and kinetics. *Seminars in Haematology* III (1967), No. 4, 235.
132. Powsner, E. R. and L. Berman. Effect of erythropoietin on DNA synthesis by erythroblasts *in vitro*. *Blood* 31 (1967), 89.
133. Pribilla, W. Erythrokinetik. *Forschungsberichte des Landes Nordrhein-Westfalen* 1340 (1964), 1.
134. Rambach, W. A., H. L. Alt and J. A. D. Cooper. The mode of action and nature of a heat stable plasma erythropoietic factor. *Blood* 12 (1957), 1101.
135. Rambach, W. A., J. A. D. Cooper and H. L. Alt. The uptake of radio-iron in the bone marrow as a measure of erythropoiesis. *J. Lab. Clin. Med.* 46 (1955), 941 (Abstr.).
136. Rambach, W. A., J. A. D. Cooper and H. L. Alt. Erythropoietic effect of tissue homogenates. *J. Lab. Clin. Med.* 56 (1960), 938.
137. Reissmann, K. R., R. A. Diederich, K. Ilo and J. W. Schwans. The influence of disappearance rate and distribution space on plasma concentration of erythropoietin in normal animals. *J. Lab. Clin. Med.* 65 (1965), 967 (Abstr.).
138. Reissmann, K. R. and T. Nomura. Erythropoietin formation in isolated kidneys and liver. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., New York and London 1962.
139. Remmele, W. *Die humorale Steuerung der Erythropoese*. Springer Verlag, Göttingen-Heidelberg 1963.
140. Reynafarje, D. and J. Ramos. Influence of plasma filtrate containing erythropoietic factor on intestinal iron absorption in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109 (1962), 868.

141. Ruhenstroth -Bauer, G. Versuche zum Nachweis eines spezifischen erythropoetischen Hormons. *Namyn-Schmiederberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 211 (1950), 32.
142. Sauer, J. P., C. W. Chapman, and D. I. Gallagher. Effects of altered erythropoiesis on iron absorption. *Lab. Invest.* 20 (1969), 558.
143. Schleuter, R. J., H. Norgello and W. F. White. Erythropoietin I. Analysis of radioiron assay in fasted rats using cobalt as a reference standard. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103 (1960), 43.
144. Schooley, J. C., E. D. Zanjani and A. S. Gordon. Immunologic aspects of the biogenesis of erythropoietin. *Blood* 35 (1970), 276.
145. Sharney, U., L. Schwartz, L. R. Wasserman, S. Post and D. Leawitt. Pool systems in iron metabolism, with special reference to polycythemia vera. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 87 (1954), 489.
146. Silver, S. *Radioactive Isotopes in Medicine and Biology*. Henry Kimpton Publishers, London 1962.
147. Stohlman, F., Jr. Humoral regulation of erythropoiesis VII. Shortened survival of erythrocytes produced by erythropoietin on severe anemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107 (1961), 884. (a.)
148. Stohlman, F., Jr. The use of Fe 59 and Cr 51 for estimating red blood cell production and destruction: an interpretive review. *Blood* 18 (1961), 236. (b.)
149. Stohlman, F., Jr. Humoral regulation of erythropoiesis VIII. The kinetics of red blood cell production and the effect of erythropoietin. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, Inc., London and New York 1962.
150. Stohlman, F., Jr. *Iron 59 Preparations*. Abbott Radio-Pharmaceuticals, Chicago 1966.
151. Stohlman, F., Jr. and G. Brecher. Stimulation of erythropoiesis in sublethally irradiated rats by a plasma factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91 (1956), 1.
152. Stohlman, F., Jr., E. P. Cronkite and G. Brecher. Stimulation of erythropoiesis in irradiated dogs and rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88 (1955), 402.
153. Stuckey, W. J., G. Beltran, D. D. Lindholm and J. W. Fischer. Erythropoietin response to acute hemolysis in man on dialysis. Abstracts of XIV International Congress of Hematology, Sao Paulo 1972.

154. Suit, H. D. A technique for estimating the bone marrow cellularity in vivo using Fe 59. *J. Clin. Pathol.* 10 (1957), 267.
155. Szur, L. and M. D. Smith. Red cell production and distribution in myelosclerosis. *Brit. J. Haemat.* 7 (1961), 147.
156. Thompson, H. and H. Jeremy. Effects of acute and chronic hemolysis on iron metabolism in the Sprague-Dawley rat. *Am. J. Physiol.* 212 (1962), 510.
157. Waldman, T. A. and W. F. Rosse. Site of formation of erythropoietin. In: L. O. Jacobson and M. Doyle, Edit.: *Erythropoiesis*. Grune and Stratton, New York and London 1962.
158. Walters, H. G. Zur Wirkung von Kobalt auf die Erythropoiese. *Blut* 21 (1970), 105.
159. Weintraub, R. L., E. M. Conrad and H. W. Crossby. Regulation of intestinal absorption of iron by the rate of erythropoiesis. *Brit. J. Haemat.* 11 (1965), 432.
160. Weintraub, A., A. S. Gordon and J. F. Camiscole. The use of the hypoxia-induced polycythemic mouse in the assay and standardization of erythropoietin. *J. Lab. Clin. Med.* 62 (1963), 743.
161. Wöhler, F. Über das Depoteisen Ferritin. In: Keiderling und Freiburg, Edit.: *Eisenstoffwechsel*. George Thieme Verlag, Stuttgart 1959.
162. Yu-Tin Tei. J. Chosen M. A. 28 (1938), 129, 299, 449, 691 (zit. A. S. Gordon. Hemopoietine. *Physiol. Rev.* 39 (1959), 1).
163. Zanjani, E. D., J. F. Contrera, A. S. Gordon, G. W. Cooper, K. K. Wong and R. Katz. The renal erythropoietic factor (REF) III. Enzymatic role in erythropoietin production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125 (1967), 505.
164. Zanjani, E. D., J. C. Schooley, and A. S. Gordon. Renal Erythropoietic Factor (REF). Neutralization of in vitro generated erythropoietic activity with anti-erythropoietin. *Life Sci.* 7 (1968), 505.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 2. Juli 1934 in Sopron (Ödenburg) als Sohn des Schlachthofangestellten Ferenc Szalay und seiner Ehefrau Elisabeth geboren.

Nach Beendigung der Volksschule, bestehend aus 4 Jahren, wurde ich 1945 in das Gymnasium des Hl. Benedictus aufgenommen, an dem ich nach 8 Jahren Studium im Jahre 1952 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommer-Semester 1952 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Veterinärischen Hochschule in Budapest. Ich war im 5. Jahr dieses Studiums, als ich 1956 Ungarn verließ und nach einem kurzen Aufenthalt in Österreich nach den U.S.A. auswanderte. In den Jahren danach übte ich folgende Tätigkeiten aus:

Etwa ein Jahr arbeitete ich bei Kleintierpraktikern;

Sieben Jahre lang war ich in verschiedenen Laboratorien beschäftigt, zuerst als Labortechniker, dann als Assistent; davon im Jahr 1958 am Rockefeller-Forschungsinstitut für Medizin, in den Jahren 1962 - 1965 am Boyce Thompson Pflanzenforschungsinstitut, und in den Jahren 1965 - 1968 an der New York Universität (biologische Fakultät).

Seit 1965 bin ich amerikanischer Staatsbürger.

Nach diesen praktischen Erfahrungen nahm ich mein Studium der Tiermedizin im Sommer-Semester 1969 an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München wieder auf. Hier war ich bis zum Tierärztlichen Staatsexamen, das ich im November 1971 ablegte, immatrikuliert. Die Approbation erhielt ich im Juli 1973.

Für die hervorragende Unterstützung und Beratung bei der Ausarbeitung meiner Dissertation möchte ich Herrn Professor Dr. Helmut Kraft herzlichst danken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Tilo Hänichen für die Durchsicht meiner Arbeit.

